



2012

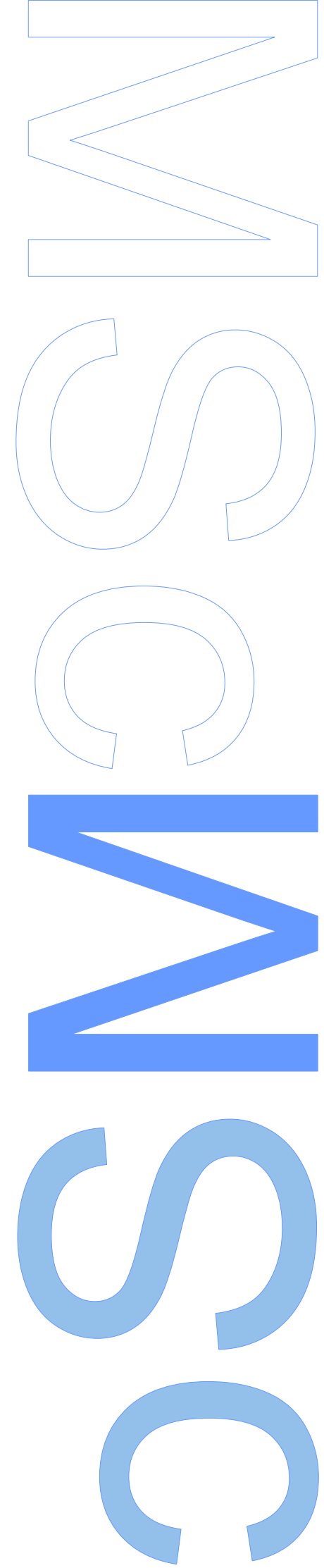
Jorge Daniel Moreira da Silva de Carvalho

Avaliação de Lipoxinas na Insuficiência cardíaca

MSC

Avaliação de lipoxinas na insuficiência cardíaca

Jorge Daniel Moreira da Silva de Carvalho
2012



Avaliação de lipoxinas na Insuficiência cardíaca

Jorge Daniel Moreira da Silva de Carvalho
Mestrado em Bioquímica

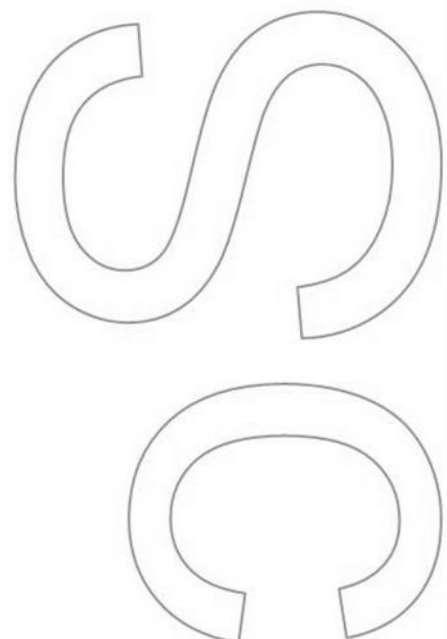
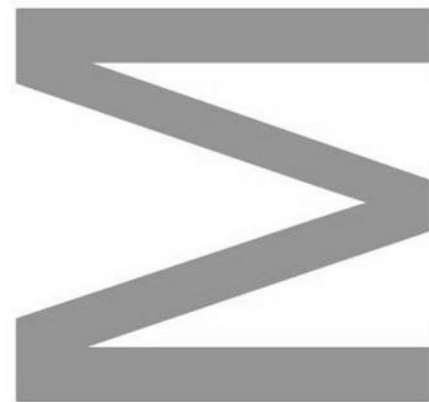
Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto 2012

Orientador

Doutora Teresa Maria de Jesus Teixeira de Sousa, Investigador Auxiliar, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Coorientador

Professor Doutor António Albino Coelho Marques Abrantes Teixeira, Professor Catedrático, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

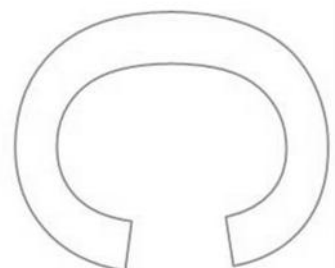
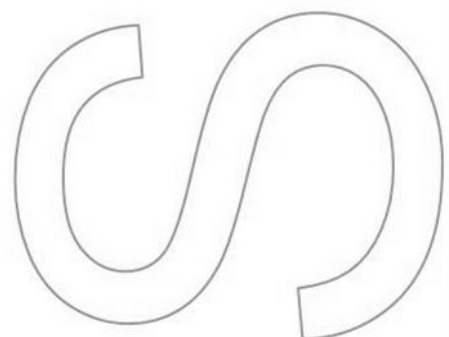
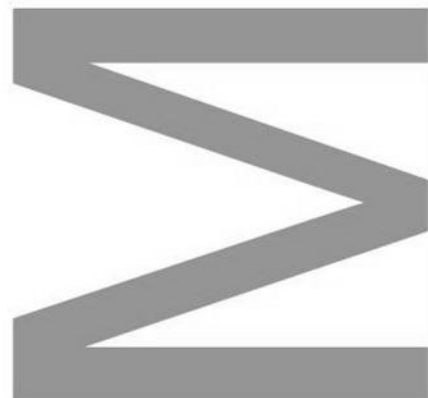


U. PORTO**FC****FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO****INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ABEL SALAZAR****FMUP****FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

Todas as correções determinadas pelo
júri, e só essas, foram efetuadas.

O presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



“Of the heart. This moves of itself and does not stop unless forever.”

LEONARDO DA VINCI

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Doutora Teresa Sousa e Professor Doutor António Albino-Teixeira, agradeço a inextinguível orientação científica que me proporcionaram, bem como as críticas construtivas e as oportunas sugestões que me colocaram ao longo deste percurso e que em muito contribuíram para o meu enriquecimento científico. Gostaria ainda, de agradecer a disponibilidade incondicional e pelo exemplo, dedicação, trabalho e busca de conhecimento.

À Maria João Valente, obrigado pela ajuda constante e crucial e por estares disponível para aquelas explicações que fazem a diferença.

Ao grupo *The little ONES*, pela boa disposição e pelos momentos de distração, descontração e diversão (Johnny, Kek e Bera).

À Dra. Marta Couto, que sem o seu apoio e colaboração este trabalho não seria possível.

A todo o grupo do Departamento de Farmacologia e Terapêutica pela disponibilidade e simpatia com que sempre me receberam.

Aos meus colegas de mestrado e amigos, em especial ao Bruno Bragança, Cátia Costa, Daniela Barros, Marina Mendes pela amizade, espírito de entreajuda e partilha de experiências e sobretudo pelos bons momentos que passamos.

Aos meus amigos de “Aveiro”, em especial a Andreia Almeida, Daniela Freitas, Filipa Oliveira pelo incentivo e apoio constante; e um agradecimento especial ao Tiago Baptista pela sua incansável amizade a qualquer hora e em qualquer momento e o incentivo, sempre tão reforçador, ao longo da concretização desta dissertação e ajuda mútua.

A todos os meus amigos de longa data que me apoiaram ao longo de todo este processo, aceitando as minhas constantes ausências.

Aos meus pais por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores e pelos diversos sacrifícios suportados, assim como os meus irmãos pelo companheirismo e habitual motivação com que pude contar ao longo deste trabalho.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

RESUMO

Introdução e objetivos: As lipoxinas (LXs) são mediadores lipídicos que promovem a resolução da inflamação e a regeneração dos tecidos. A deterioração do funcionamento cardíaco poderá resultar de um decréscimo da formação de LXs, como por exemplo a LXA₄, com consequente aumento da ativação leucocitária, inflamação e fibrose. Recentemente foi também descrito que o ácido acetilsalicílico (AAS) induz a síntese de 15-epi-LXA₄ e que este efeito poderá contribuir para a proteção cardiovascular conferida por este fármaco. No entanto, apesar do interesse crescente nos mecanismos de proteção mediados pelas LXs não há ainda estudos sobre o seu papel na patogénese e progressão da insuficiência cardíaca (IC). Assim, este estudo pretendeu avaliar a relação entre a biodisponibilidade de LXs e o estadio de IC, e a correlação destes parâmetros com marcadores específicos de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo. Analisou-se ainda o impacto da terapêutica com AAS na concentração de 15-epi-LXA₄, LXA₄ e restantes marcadores de disfunção/lesão cardíaca, inflamatória ou redox em doentes com IC.

Métodos: Foram selecionados 34 doentes com IC crónica (ICC) (classes New York Heart Association, NYHA, I a IV). As quantificações do peptídeo natriurético de tipo B (BNP), troponina, ácido úrico (AU), proteína reativa C (PRC), creatinina, assim como a contagem de leucócitos, foram realizadas no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de São João. A capacidade antioxidante do plasma (TAS), concentração de mieloperoxidase (MPO), H₂O₂, isoprostanos, LXA₄ e 15-epi-LXA₄ foram avaliados utilizando *kits* comerciais e a atividade da MPO foi analisada por um ensaio de cinética enzimática monitorizada espectrofotometricamente.

Resultados: Os 34 doentes foram estratificados em ICC moderada (classes NYHA I, I/II) e ICC grave (classes NYHA II/III, III e III/IV). Nos doentes com ICC grave verificou-se uma diminuição significativa de LXA₄ plasmática e da excreção diária de 15-epi-LXA₄ e um aumento significativo do BNP, atividade MPO e TAS. Observou-se ainda uma correlação negativa significativa entre a LXA₄ plasmática e os marcadores BNP, troponina, PRC e AU. O tratamento com AAS induziu um aumento significativo da excreção urinária de 15-epi-LXA₄ nos doentes com ICC moderada. Este efeito foi acompanhado por uma redução do BNP nestes doentes, embora não significativa.

Conclusões: O agravamento da ICC está associado a uma redução significativa da LXA₄ sistémica e aumento da atividade da MPO plasmática. A correlação inversa da LXA₄ com diversos marcadores estabelecidos de IC sugere a importância deste mediador na fisiopatologia da ICC, e a sua provável utilidade como biomarcador nesta patologia. O tratamento com AAS aumenta a excreção urinária de 15-epi-LXA₄ nos doentes com IC moderada. Este efeito parece contribuir para a melhoria da função cardíaca.

PALAVRAS-CHAVE

Insuficiência cardíaca, LXA₄, 15-epi-LXA₄, stresse oxidativo, inflamação, ácido acetilsalicílico

ABSTRACT

Introduction and aims: Lipoxins (LXs) are anti-inflammatory lipid mediators that promote the resolution of inflammation and tissue regeneration. It has been hypothesized that cardiac dysfunction may be secondary to a deficiency in LXA₄ formation and consequent enhancement of leucocyte activation, inflammation and fibrosis. Acetylsalicylic acid (ASA) was recently shown to induce 15-epi-LXA₄ production which may contribute to cardiovascular protection. However, despite the protective effects of LXs, little is known about their actions in the pathogenesis and progression of heart failure (HF). Therefore, this study aimed at evaluating the bioavailability of LXs in chronic HF and at investigating the correlation of these lipid mediators with specific markers of cardiac dysfunction/injury, inflammation and oxidative stress. Furthermore, the effect of ASA on LXs production and on inflammatory, redox and HF biomarkers was also investigated.

Methods: Thirty-four patients with CHF were selected (New York Heart Association, NYHA, functional class I to IV). Evaluations of B-type natriuretic peptide (BNP), troponin, C-reactive protein (CRP), uric acid (UA), creatinine and leucocyte counts were performed in the Clinical Pathology Laboratory of Hospital de São João. The total antioxidant status (TAS), myeloperoxidase (MPO) concentration, H₂O₂, isoprostanes, LXA₄ and 15-epi-LXA₄ were evaluated using commercial kits, while MPO activity was measured through a spectrophotometric method.

Results: The thirty-four patients were stratified into mild (NYHA class I, I / II) and severe (NYHA class II / III, and III / IV) chronic heart failure (CHF). Patients with severe CHF exhibited significantly lower levels of plasma LXA₄ and decreased urinary excretion of 15-epi-LXA₄ when compared to patients with mild chronic heart failure. We also observed a significant increase in BNP, MPO activity and TAS levels in patients with severe CHF. Significant negative correlations were verified between plasma LXA₄ levels and BNP, troponin, CRP and UA. Treatment with ASA significantly increased urinary excretion of 15-epi-LXA₄ and attenuated BNP levels in mild CHF patients.

Conclusions: Worsening of CHF is associated with a significant reduction of systemic LXA₄ and increased MPO activity. The inverse correlation of LXA₄ with HF biomarkers suggests its importance in CHF physiopathology and its likely usefulness as a biomarker in this disease. Furthermore, the AAS induced-increase in urinary excretion of 15-epi-LXA₄ appears to improve cardiac function in mild CHF patients.

KEYWORDS

Heart failure, LXA₄, 15-epi-LXA₄, oxidative stress, inflammation, acetylsalicylic acid

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	11
I - INTRODUÇÃO.....	15
II - REVISÃO DA LITERATURA	19
1. O coração e a IC.....	19
1.1. Patogénese da IC.....	20
1.2. Classificação da IC	21
1.3. O papel da inflamação na IC	22
1.4. O papel da oxidação na IC	23
1.5. Biomarcadores na IC	24
1.6. Biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca.....	25
1.6.1. Péptido natriurético tipo-B (BNP)	25
1.6.2. Troponina	26
1.7. Biomarcadores inflamatórios	27
1.7.1. Proteína reativa C (PRC).....	27
1.7.2. Leucócitos	28
1.7.3. Mieloperoxidase (MPO)	28
1.8. Biomarcadores de stresse oxidativo	30
1.8.1. Ácido úrico (AU)	30
1.8.2. Capacidade antioxidante total (<i>total antioxidant status</i> , TAS)	31
1.8.3. Isoprostanos (Isop)	31
1.8.4. H ₂ O ₂	32
1.9. Resolução da inflamação.....	32
2. Lipoxinas	34
2.1. Biossíntese de lipoxinas A ₄ e B ₄	35
2.2. Biossíntese de 15-epi-lipoxinas	35
2.3. Recetor de lipoxinas.....	36
2.4. Ação das lipoxinas.....	37
2.5. Inativação metabólica de lipoxinas	37
III - OBJETIVOS	43

IV - MATERIAL E MÉTODOS.....	47
1. Processamento das amostras e análise de marcadores de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo.....	47
1.1. Processamento do sangue e urina.....	47
1.2. Marcadores de IC: BNP e troponina.....	47
1.3. Marcadores inflamatórios.....	48
1.3.1. Proteína reativa C.....	48
1.3.2. Contagem de leucócitos totais e contagem diferencial de leucócitos.....	48
1.3.3. Concentração da MPO.....	48
1.3.4. Atividade da MPO.....	48
1.3.5. Lipoxinas.....	49
1.3.5.1. Extração.....	49
1.3.5.2. Doseamento.....	50
1.4. Marcadores de stresse oxidativo.....	50
1.4.1. Ácido úrico.....	50
1.4.2. Capacidade antioxidante total.....	50
1.4.3. H ₂ O ₂ e Isop.....	50
2. Resumo dos métodos analíticos.....	51
3. Análise de resultados e estatística.....	51
V - RESULTADOS.....	55
A - Dados demográficos dos doentes.....	55
B - Marcadores de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo.....	56
1. Biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca.....	56
2. Marcadores Inflamatórios.....	56
2.1. PRC.....	56
2.2. Leucócitos totais, neutrófilos, monócitos e linfócitos.....	57
2.3. MPO.....	57
2.4. LXs.....	58
2.4.1. Concentração sistémica de LXA ₄ e 15-epi-LXA ₄	58
2.4.2. Excreção urinária de LXA ₄	59
2.4.3. Excreção urinária de 15-epi-LXA ₄	59
3. Marcadores de stresse oxidativo.....	60
3.1. AU e TAS.....	60
3.2. Excreção urinária de H ₂ O ₂ e Isop.....	60
C - Estudo da correlação entre as lipoxinas e biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca, de inflamação e de stresse oxidativo.....	61

D - Influência da terapêutica com AAS na concentração de LXs e outros biomarcadores	63
1. Efeito do tratamento com AAS na concentração sistémica de LXA ₄ e 15-epi-LXA ₄	63
2. Efeito do tratamento com AAS na excreção urinária de LXA ₄	63
3. Efeito do tratamento com AAS na excreção urinária de 15-epi-LXA ₄	64
4. Efeito do tratamento com AAS nos restantes marcadores inflamatórios e de stresse oxidativo	64
5. Efeito do tratamento com AAS nos marcadores de disfunção/lesão cardíaca	64
VI - DISCUSSÃO	69
VII - CONCLUSÃO	77
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

12-LOX	12-Lipoxigenase
15-epi-LXA₄	15-epi-lipoxina A ₄
15-epi-LXB₄	15-epi-lipoxina B ₄
15-LOX	15-Lipoxigenase
15<i>R</i>-HETE	Ácido 15- <i>R</i> -hidroxieicosatetraenoico
15<i>S</i>-HPETE	Ácido 15-hidroperoxieicosatetranoico
5(<i>S</i>)-HPETE	Ácido 5-hidroperoxieicosatetranoico
5-LOX	5-Lipoxigenase
AA	Ácido araquidónico
AAS	Ácido acetilsalicílico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ALX	Recetor de Lipoxinas
AP1	Proteína ativadora 1
ATLs	Lipoxinas induzidas pela aspirina
AU	Ácido úrico
BLT₁	Recetor do leucotrieno B ₄
BNP	Péptido natriurético tipo B
CCR5	Recetor de tipo 5 para quimiocinas
CINC1	Fator quimiotático de tipo 1 para neutrófilos induzido por citocinas
CL⁻	Cloreto
COX-1	Cicloxygenase de tipo 1
COX-2	Cicloxygenase de tipo 2
CTGF	Fator de crescimento de tecido conjuntivo
CTGFR	Recetor do fator de crescimento de tecido conjuntivo
ERK	Cínases reguladas por sinais extracelulares
GFR	Recetor de fator de crescimento
GPCR	Recetor acoplado à proteína G
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
IC	Insuficiência cardíaca
ICC	Insuficiência cardíaca crónica
IL-6	Interleucina-6
InsP3	Trifosfato de inositol

Isop	Isoprostanos
JNK	Cínase do terminal amínico da proteína c-Jun
LOX	Lipoxigenases
LPC	Lisofosfatidilcolina
LT	Leucotrieno
LTA₄	Leucotrieno A ₄
LXA₄	Lipoxina A ₄
LXB₄	Lipoxina B ₄
LXs	Lipoxinas
MDRS	Espécies reativas derivadas da mieloperoxidase
mmLDL	LDL minimamente modificado
MMP3	Metaloproteinase de tipo 3 da matriz extracelular
MPO	Mieloperoxidase
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Monóxido de Azoto
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
oxoHDL	HDL oxidado
oxoLDL	LDL oxidado
PDGFR	Recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina
PGG2	Prostaglandina G2
PKC	Cínases C de proteínas
PMNs	Células polimorfonucleares
PPAR	Recetor ativador da proliferação de peroxissomas
PRC	Proteína reativa C
ROS	Espécies reativas do oxigénio
SCN⁻	Tiocianato
TAS	Capacidade antioxidante total
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Recetor do fator de crescimento do endotélio vascular
XO	Xantina oxidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução da mortalidade em Portugal desde 1960. Fontes/Entidades: INE–DGS/MS, INE, PORDATA.....	15
Figura 2 - Condições que causam IC pela diminuição da função sistólica ou diastólica ventricular (Lilly 2010).....	21
Figura 3 - Vias da Inflamação aguda: resolução ou inflamação crónica, (adaptado de Serhan, Chiang <i>et al.</i> 2008).	23
Figura 4 - Vias funcionais da PRC. Na resposta às citocinas como a IL-6, a expressão hepática da PRC aumenta. A PRC circulante promove uma série de ações como a opsonização de bactérias e células apoptóticas e a libertação de células fagocíticas de citocinas imunomoduladoras (adaptado de Rhodes, Furnrohr <i>et al.</i> 2011).....	27
Figura 5 - Efeitos da MPO nos vasos sanguíneos. A MPO é libertada pelos macrófagos em estados inflamatórios e catalisa a formação de espécies reativas derivadas da MPO (MDRS) usando o cloreto (Cl ⁻), o tiocianato (SCN ⁻), o monóxido de azoto (NO) como substratos e o H ₂ O ₂ como co-substrato. O consumo de NO pela MPO pode prejudicar a vasodilatação dependente do endotélio. As MDRS promovem também a aterosclerose por vários mecanismos: exacerbam a oxidação de partículas de LDL (mmLDL, LDL minimamente modificado) iniciada por outras ROS, formando o LDL oxidado (oxoLDL); o oxoLDL é depois fagocitado pelos macrófagos, originando as células espumosas que se acumulam junto ao endotélio formando a placa de ateroma; as MDRS oxidam ainda o HDL formando HDL oxidado (oxoHDL) o que diminui o efeito protetor do HDL e inibe o transporte reverso de colesterol. As MDRS podem ainda contribuir para a rutura das placas de ateroma por enfraquecimento da camada fibrosa. (adaptado de Schindhelm, van der Zwan <i>et al.</i> 2009).	29
Figura 6 - A) Efeitos da LXA ₄ no recrutamento de neutrófilos e células mononucleares – Os gradientes quimiotáticos endógenos e exógenos estimulam o recrutamento de neutrófilos que é amplificado pela produção local de LTB ₄ . Durante a progressão de eventos inflamatórios nos tecidos, as interações entre plaquetas e leucócitos induzem a formação de LXA ₄ e LXB ₄ . Estas lipoxinas inibem o recrutamento de neutrófilos e estimulam a infiltração não-inflamatória de monócitos. B) Dupla ação, anti-inflamatória e de pró-resolução, de lipoxinas, resolvinas e protectinas (adaptado de Serhan, Chiang <i>et al.</i> 2008).....	33

Figura 7 - Mecanismos de ação da LXA ₄ . A generalidade dos efeitos da LXA ₄ <i>in vivo</i> é possivelmente mediada pela sua interação com recetores acoplados a proteínas G (GPCRs) e com recetores de fatores de crescimento. A ativação do recetor da LXA ₄ (ALX) resulta em eventos de sinalização específicos, dependentes do tipo de células envolvidas, que inibem a migração de neutrófilos e estimulam a ativação de monócitos e macrófagos. A inibição indireta, mediada pela interação com outros GPCRs, tais como o BLT ₁ (recetor do LTB ₄) e recetores de fatores de crescimento, como o VEGFR (recetor do fator de crescimento do endotélio vascular) expresso nas células endoteliais, o PDGFR (recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas) e o CTGFR (recetor do fator de crescimento do tecido conjuntivo) expressos nas células mesangiais, reduz a angiogénese, a proliferação das células mesangiais e a fibrose (adaptado de Serhan, Chiang <i>et al.</i> 2008).	34
Figura 8 - Metabolismo de lipoxinas (LXA ₄ , LXB ₄ , 15-epi-LXA ₄ e 15-epi-LXB ₄) (Stables and Gilroy 2011).	36
Figura 9 - Representação da inativação enzimática de LXA ₄ . O primeiro passo é a desidrogenação do grupo 15-hidroxilo catalisada pela 15-PGDH, seguido da redução da ligação dupla 13-14 pela EOR (Chiang, Arita <i>et al.</i> 2005).	39
Figura 10 - Concentração plasmática do BNP (A) e troponina (B) em doentes com ICC moderada (n=18) e grave (n=15). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>). * <i>p</i> <0.05 vs. doentes com ICC moderada.	56
Figura 11 - Concentração plasmática da PRC em doentes com ICC moderada (n=18) e grave (n=16). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>).	57
Figura 12 - Leucócitos totais (A), monócitos (B), neutrófilos (C), linfócitos (D), e rácio neutrofilos/linfócitos (E) em doentes com ICC moderada (n=18) e grave (n=16). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>).	57
Figura 13 - Concentração (A) e atividade (B) MPO plasmática em doentes com ICC moderada (n=18) e grave (n=16). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>). * <i>p</i> <0.05 vs. doentes com ICC moderada.	58
Figura 14 - Concentração plasmática de LXA ₄ (A) e de 15-epi-LXA ₄ (B) em doentes com ICC moderada (n=17) e grave (n=15). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>). * <i>p</i> <0,05 vs. doentes ICC moderada.	58
Figura 15 - Excreção urinária de LXA ₄ por dia (A), por clearance estimada de creatinina (B) e por creatinina urinária (C) em doentes com ICC moderada (n=16-17) e grave (n=15-16). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>).	59

Figura 16 - Excreção urinária de 15-epi-LXA ₄ por dia (A), por clearance estimada de creatinina (B) e por creatinina urinária (C) em doentes com ICC moderada (n=16-17) e grave (n=15-16). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>). * $p<0,05$ vs. doentes ICC moderada.	59
Figura 17 - Concentração sérica de AU (A) e TAS no plasma (B) de doentes com ICC moderada (n=14-17) e grave (n=9-15). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>). *** $p<0,001$ vs. doentes com ICC moderada.	60
Figura 18 - Excreção urinária de H ₂ O ₂ (A) e de Isop (B) em doentes com ICC moderada (n=14-16) e grave (n=8-14). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>).	60
Figura 19 - Efeito do tratamento com AAS na concentração plasmática de LXA ₄ (A) e 15-epi-LXA ₄ (B) em doentes com ICC moderada (n=8 s/AAS vs. 9 c/AAS) e doentes com ICC grave (n=10 s/AAS vs. 5 c/AAS). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>).	63
Figura 20 - Efeito do tratamento com AAS na excreção urinária de LXA ₄ em doentes com ICC moderada (n=8 s/AAS vs. 8 c/AAS) e ICC grave (n=10 s/AAS vs. 5 c/AAS): excreção por dia (A), excreção por clearance estimada de creatinina (B), e excreção por creatinina urinária (C). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>).	63
Figura 21 - Efeito do tratamento com AAS na excreção urinária de 15-epi-LXA ₄ em doentes com ICC moderada (n=8 s/AAS vs. 8 s/AAS) e ICC grave (n=9 s/AAS vs. 5 c/AAS): excreção por dia (A), excreção por clearance estimada de creatinina (B) e excreção por creatinina urinária (C). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$	64
Figura 22 - Efeito do tratamento com AAS na concentração plasmática do BNP em doentes com ICC moderada (n=8 s/ AAS vs. 10 c/AAS) e ICC grave (n=10 s/AAS vs. 5 c/AAS). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (<i>Box-and-Whiskers-Plot</i>).	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da IC (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008).....	22
Tabela 2 - Classificação da IC pelos sintomas e capacidade física (NYHA). (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008)	22
Tabela 3 - Biomarcadores na IC. Adaptado de (Braunwald 2008).....	25
Tabela 4 - Principais ações das LXA ₄ e 15-epi-LXA ₄ (Serhan, Chiang et al. 2008).	38
Tabela 5 - Lista dos testes para os biomarcadores do estudo.	51
Tabela 6 - Distribuição dos doentes NYHA (Classe I/II e III/IV) por género, idade, peso e terapêutica com AAS.	55
Tabela 7 - Correlações entre a LXA ₄ plasmática e os biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo (n= 22-34).	61
Tabela 8 - Correlações entre a 15-epi-LXA ₄ plasmática e os biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo (n= 22-34).....	62

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

As alterações patológicas que afetam o coração e/ou os vasos sanguíneos são genericamente designadas por doenças cardiovasculares ou do aparelho circulatório. Estas são a principal causa de morte em Portugal e uma das mais preponderantes na Europa e no Mundo. Tais patologias representaram 31,9% das mortes em 2009 surgindo logo a seguir os tumores com 23,2% (Fontes/Entidades: INE–DGS/MS, INE, PORDATA) (Figura 1).

A insuficiência cardíaca (IC) é um termo médico referente a uma síndrome clínica, complexa e progressiva, e não a uma doença específica, dado que consiste num conjunto de sintomas e sinais que traduzem a incapacidade do coração bombear sangue para os vários órgãos do organismo, diminuindo a sua perfusão e, deste modo, o aporte de oxigénio essencial para as suas funções.

Relativamente à sua epidemiologia, a IC é um problema de saúde pública, agravado pelo aumento da população com idade superior a 65 anos. Embora seja visível um decréscimo nas últimas duas décadas, Portugal continua a ser um dos países com maior taxa de mortalidade da Europa.

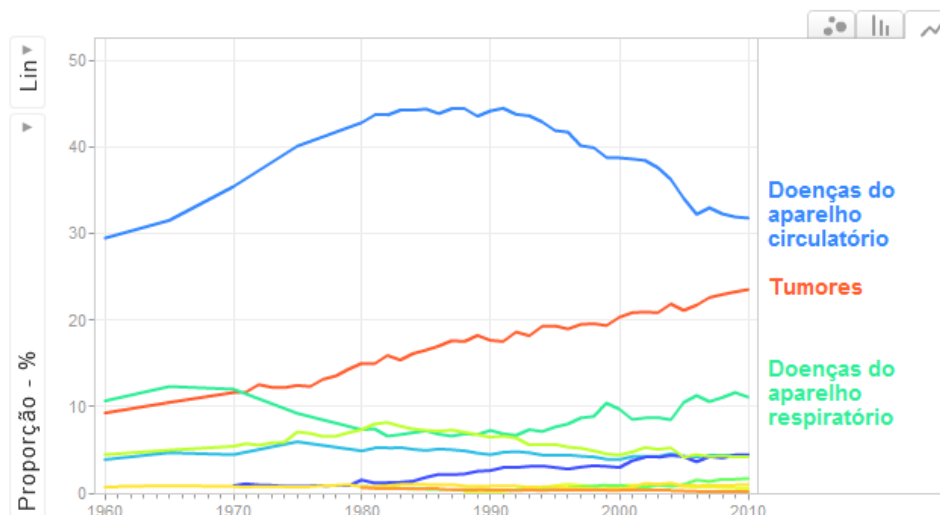


Figura 1 - Evolução da mortalidade em Portugal desde 1960. Fontes/Entidades: INE–DGS/MS, INE, PORDATA

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

II - REVISÃO DA LITERATURA

1. O coração e a IC

A estrutura anatómica, a composição celular e as vias de condução do coração formam um sistema eficaz para a produção de contrações organizadas e eficientes. Como resultado, o coração é capaz de promover milhares de milhões de estímulos durante o tempo de vida de uma pessoa. Em cada ciclo de contração, o coração, recebe e ejeta sangue através da circulação fornecendo nutrientes e recebendo produtos do metabolismo celular dos tecidos do corpo. O coração recebe o sangue a baixas pressões de enchimento, durante a diástole e, de seguida, promove a sua ejeção a pressões mais elevadas, durante a sístole (Poole-Wilson 2005; Maeder and Kaye 2009; McMurray 2010).

A IC foi durante muito tempo considerada uma doença incurável com uma esperança de recuperação muito baixa. No final do século XX, o desenvolvimento de novos tratamentos, resultantes do conhecimento hemodinâmico e neuro-hormonal da doença, transformou a insuficiência cardíaca numa doença crónica. No entanto, a prevalência desta doença em todo o mundo continua a aumentar, estando associada a altas taxas de morbimortalidade e a elevados custos humanos, sociais e económicos (Rosamond 2008).

A IC é muitas vezes a manifestação final e mais grave de quase todos os tipos de doenças cardíacas, incluindo aterosclerose coronária, enfarte do miocárdio, doenças valvulares, hipertensão, doença coronária congénita e cardiomiopatias (Maeder and Kaye 2009).

Os sintomas da IC desenvolvem-se, geralmente, de forma gradual, determinando uma diminuição progressiva de atividade nestes doentes, e a ocorrência de episódios cada vez mais frequentes de insuficiência cardíaca aguda (conhecida como descompensação). O tratamento da condição aguda centra-se em abordagens hemodinâmicas que não têm tido avanços significativos na última década, comparativamente com o grande desenvolvimento de tratamentos farmacológicos direcionados para a condição crónica (Mudd and Kass 2008).

1.1. Patogénese da IC

A IC desenvolve-se quando o coração não consegue fornecer o fluxo sanguíneo e/ou pressão adequada às necessidades circulatórias do organismo (Mudd and Kass 2008) e surge devido a anomalias hereditárias ou adquiridas da estrutura e/ou função cardíaca (Shah and Mann 2011). As causas mais comuns incluem distúrbios que cronicamente aumentam a carga de trabalho cardíaco (perda de massa muscular devida a enfarte do miocárdio) e sobrecargas de pressão devido à hipertensão arterial (Mudd and Kass 2008; Lilly 2010) (Figura 2).

A redução do débito cardíaco e disfunção do miocárdio levam à expansão do volume intravascular e ativação dos sistemas neuro-hormonais, mais particularmente do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina. Estas respostas compensatórias mantêm a perfusão dos órgãos vitais, aumentando a pré-carga ventricular esquerda e estimulando a contração do miocárdio e o aumento do tónus arterial. Estes mecanismos ajudam a manter o débito cardíaco, promovendo altos volumes diastólicos no coração. No entanto, cada uma destas respostas compensatórias também contribui para a progressão da doença. A expansão do volume intravascular e os elevados volumes ventriculares aumentam a tensão diastólica e sistólica da parede e podem prejudicar o balanço energético do miocárdio e induzir hipertrofia (Lilly 2010; Robbins, Kumar et al. 2010; Lüllmann 2011).

A ativação neuro-hormonal promove a constrição arterial e venosa, a hipertrofia e/ou apoptose dos cardiomiócitos, a proliferação de fibroblastos e a acumulação de colagénio intersticial, determinando uma remodelação adversa que compromete a fração de ejeção e a pré-carga e aumenta a tensão nas paredes do coração (Ramani, Uber et al. 2010; Gajarsa and Kloner 2011). Estudos clínicos e experimentais concluíram que a remodelação cardíaca é um processo fundamental na progressão da IC, especialmente em doentes com enfarte do miocárdio, e envolve mudanças significativas na expressão génica e função proteica, tanto na matriz extracelular como nos cardiomiócitos (Choi, Saric et al. 2011; Gajarsa and Kloner 2011). Embora a remodelação ventricular possa inicialmente ser favorável, normalizando o stresse da parede e mantendo a função contrátil em resposta à perda ou aumento de massa muscular, com o tempo verifica-se uma dilatação ventricular progressiva, que aumenta a fibrose intersticial e promove o desenvolvimento de arritmia, além de causar uma diminuição do fluxo sanguíneo (Grieve and Shah 2003; Choi, Saric et al. 2011).

Os mecanismos compensatórios da IC, incluindo a estimulação neuro-hormonal dos órgãos, a ativação de cascatas de sinalização intracelular no coração e vasos

sanguíneos e a retenção de sal e água nos rins, aumentam a probabilidade de falência dos órgãos e pioram o prognóstico clínico (Mudd and Kass 2008; Lilly 2010).

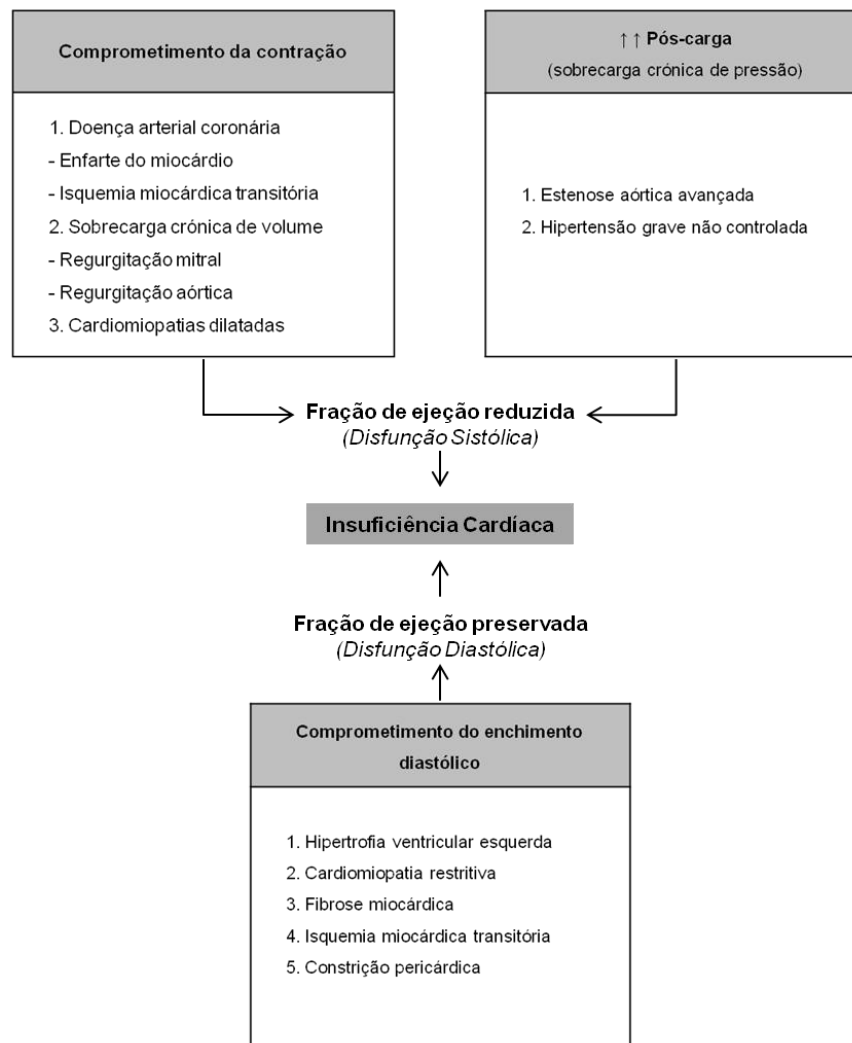


Figura 2 - Condições que causam IC pela diminuição da função sistólica ou diastólica ventricular (Lilly 2010)

1.2. Classificação da IC

A IC pode ser classificada como aguda ou crónica, consoante a rapidez com que se desenvolve e a necessidade de tratamento urgente ou a longo-prazo. Assim, a IC aguda caracteriza-se por um início abrupto de sintomas e sinais de disfunção cardíaca e por uma necessidade urgente de tratamento. Por sua vez, a IC crónica (ICC) desenvolve-se lentamente, pode gradualmente piorar e requer um tratamento a longo prazo.

É de notar que a palavra "agudo" pode ter vários significados podendo indicar gravidade ou descompensação, caso recente, ou mesmo novo caso (Niemenen, Bohm et al. 2005). Assim foi criada uma nova classificação de IC: 1) novo caso de IC (aguda ou

aparecimento lento), 2) IC transitória (recorrente) e 3) ICC (persistente) (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação da IC (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008)

De novo	Primeira apresentação Agudo ou início lento
Transitória	Recorrente ou episódico
Crónica	Persistente Estável, agravamento ou descompensação

A IC é dividida em ligeira, moderada e grave, com base na avaliação clínica dos sintomas. A designação de IC ligeira é usada para caraterizar doentes que se podem movimentar sem limitações importantes enquanto a IC grave se refere a doentes sintomáticos que requerem cuidados médicos frequentes (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008). A classificação mais utilizada e clinicamente mais útil é a da NYHA - *New York Heart Association*, que divide a IC em 4 estadios de acordo com os sintomas e a capacidade física dos doentes (Dickstein 1999; Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008) (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação da IC pelos sintomas e capacidade física (NYHA). (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008)

Classificação funcional NYHA	
Gravidade baseada nos sintomas e capacidade física	
Classe I	Sem limitações para atividade física. Atividade usual não causa fadiga excessiva, palpitação ou dispneia
Classe II	Ligeira limitação das atividades. Confortável em repouso, atividade física usual resulta em fadiga, palpitações e dispneia
Classe III	Limitação grave da atividade física. Confortável em repouso, mas atividade mais leve que a usual causa fadiga, palpitações e dispneia
Classe IV	Incapacidade de realizar qualquer atividade física sem desconforto. Sintomas de insuficiência cardíaca em repouso. A atividade física agrava o desconforto

1.3. O papel da inflamação na IC

A inflamação é uma importante resposta celular ativada por fatores de natureza mecânica, química ou imunológica. O balanço entre estes fatores locais regula a

inflamação, determinando a progressão ou resolução do processo inflamatório (Huwiler and Pfeilschifter 2009).

A inflamação é reconhecida como uma característica central na patogénese e progressão de várias doenças (Levine, Kalman et al. 1990; Braunwald 2008), causada principalmente por mediadores eicosanóides derivados do ácido araquidónico (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) (Schaloske and Dennis 2006) e por componentes do complemento (C5a) (Serhan, Chiang et al. 2008) (Figura 3).

Os primeiros dados sobre a relação entre IC e inflamação remontam a um estudo de 1956 (Elster *et al.*, 1956) em que foi observada uma correlação positiva entre a concentração da Proteína Reativa C (PRC) e a gravidade da insuficiência cardíaca congestiva. Em 1990, outros autores (Levine *et al.*, 1990) descreveram também uma elevação da concentração do fator de necrose tumoral α (TNF- α) circulante em doentes com IC. Pesquisas realizadas desde então têm revelado novos dados acerca da relação entre citocinas e a IC. Atualmente sabe-se que a IC resulta em grande parte, de um desequilíbrio entre mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios (Mann 2002; Heymans, Hirsch et al. 2009).

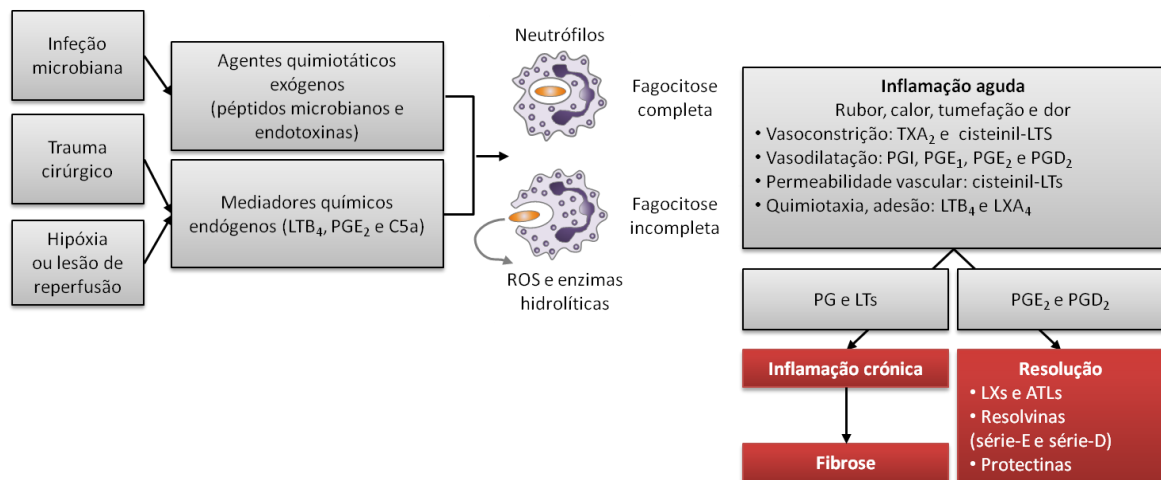


Figura 3 - Vias da Inflamação aguda: resolução ou inflamação crônica, (adaptado de Serhan, Chiang *et al.* 2008).

1.4. O papel da oxidação na IC

O stresse oxidativo é referido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), e os mecanismos de defesa antioxidantes endógenos (Grieve and Shah 2003), com prevalência de um estado pró-oxidante potencialmente prejudicial para a viabilidade, sinalização e função das células.

A produção de ROS, incluindo radicais livres como o superóxido, e espécies não-radicaux como o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), é cada vez mais reconhecida como um

importante contribuinte para a patogénese e progressão da IC. O aumento da concentração de marcadores de stresse oxidativo em doentes com IC está correlacionado com a disfunção miocárdica e agravamento geral da IC (Ungvari, Gupte et al. 2005; Takimoto and Kass 2007).

As ROS podem exercer múltiplos efeitos relevantes para a fisiopatologia de IC (Finkel 1999). As lesões oxidativas nas proteínas celulares podem induzir disfunção celular ou morte por apoptose ou necrose (Finkel 1999; Finkel 2011) que por sua vez estão associadas a arritmias e a disfunção endotelial (Grieve and Shah 2003).

O processo de quantificação direta de ROS é dificultado pela instabilidade da maioria destas moléculas. Assim, a avaliação de stresse oxidativo em patologias humanas tem sido frequentemente realizada com base na quantificação de marcadores indiretos como a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, a peroxidação lipídica (malonildialdeído, isoprostanos) e a concentração e atividade da mieloperoxidase (MPO) no plasma e urina (Kameda, Matsunaga et al. 2003; Polidori, Pratico et al. 2004).

1.5. Biomarcadores na IC

A natureza multifatorial da IC, incluindo lesões, sobrecarga cardíaca, interações genéticas, alterações neuro-hormonais, inflamatórias e bioquímicas, entre outras, justifica, de certo modo, o crescente interesse e a relevância clínica de biomarcadores de stresse e disfunção do coração, tais como enzimas, hormonas e outras substâncias biológicas (Braunwald 2008).

De acordo com Morrow *et al.* (2007), os biomarcadores devem cumprir três critérios que os tornam úteis: i) possibilitar medições precisas e reprodutíveis, disponíveis para a atividade clínica num curto intervalo de tempo e com custos acessíveis; ii) fornecer informação não disponível numa avaliação clínica e iii) auxiliar a decisão médica com base na concentração quantificada. Apesar de poucos biomarcadores satisfazerem todos os critérios anteriormente referidos, muitos deles facultam informações importantes relacionadas com a patogénese de IC ou a identificação de indivíduos de risco, e podem ainda ser úteis para a estratificação do risco, o estabelecimento do diagnóstico de IC ou a monitorização desta doença (Braunwald 2008). É de notar que biomarcadores podem ser fatores de risco e, portanto, podem ser potenciais alvos de terapia (Tabela 3).

A pesquisa de novos e melhores biomarcadores está em constante evolução, pretendendo-se que estes tenham um importante valor prognóstico na avaliação clínica convencional, fornecendo informações sobre a manifestação da doença antes do aparecimento de alterações estruturais e fisiológicas evidentes.

Tabela 3 - Biomarcadores na IC. Adaptado de (Braunwald 2008)

Inflamação*†‡	Lesão dos Miócitos *†§
Proteína reativa C	Troponinas I e T
Fator de necrose tumoral α	Cínase da miosina de cadeia-leve I
Fas (APO-1)	Proteína cardíaca de ligação ácidos-gordos
Interleucina 1, 6, e 18	Cínase da creatina (CK-MB)
Stresse Oxidativo *†§	Stresse dos Miócitos †‡§¶
Lipoproteínas baixa densidade oxidadas	Péptido natriurético tipo-B
Mieloperoxidase	Terminal amínico do pró-péptido natriurético tipo-B
Biopirrinhas urinárias	Pró-adrenomedulina
Isoprostanos urinários e plasmáticos	ST2
Malonidialdeído plasmático	Novos Biomarcadores†
Remodelação matriz-extracelular *†§	Cromogranina
Metaloproteinases da matriz extracelular	Galectina 3
Inibidores teciduais de metaloproteinases	Osteoprotegerina
Pro-péptidos colagénio	Adiponectina
Neuro-hormonas*†§	Fator de diferenciação-15
Noradrenalina	<p>* Biomarcadores nesta categoria ajudam na compreensão da patogénese de IC. † Biomarcadores nesta categoria providenciam informações prognósticas e melhoram a estratificação de risco. ‡ Biomarcadores nesta categoria podem ser usados para identificar indivíduos com risco de IC. § Biomarcadores nesta categoria são potenciais alvos de terapia ¶ Biomarcadores nesta categoria são úteis no diagnóstico de IC e monitorização da terapia</p>
Renina	
Angiotensina II	
Aldosterona	
Endotelina	

1.6. Biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca

1.6.1. Péptido natriurético tipo-B (BNP)

Os péptidos natriuréticos, incluindo o peptídeo natriurético auricular (*Atrial natriuretic peptide*, ANP), o péptido natriurético tipo-B (*B-type natriuretic peptide*, BNP) e o peptídeo natriurético tipo-C (*C-type natriuretic peptide*, CNP), são importantes mecanismos contra-reguladores na IC, havendo uma elevação significativa das suas concentrações sistémicas e/ou tecidulares no contexto desta patologia. Estes peptídeos, principalmente o BNP e o seu fragmento terminal amínico inativo (NT-pró-BNP), têm vindo a assumir uma crescente relevância clínica como biomarcadores de IC (Braunwald 2008). A formação destes compostos é iniciada com a síntese de um precursor inativo (pré-hormona) que posteriormente é clivado originando a formação de BNP ativo, que representa o fragmento terminal carboxílico, e de NT-pró-BNP, fragmento terminal amínico, sem atividade fisiológica conhecida (Levin, Gardner et al. 1998; Braunwald 2008). Estes dois péptidos são libertados principalmente dos ventrículos cardíacos em resposta ao estiramento e/ou tensões dos miócitos (Levin, Gardner et al. 1998;

Kragelund, Gronning et al. 2005) e, além de refletirem o stresse da parede ventricular estão também associados a outros eventos cardiovasculares de risco (Goetze, Christoffersen et al. 2003). O BNP apresenta uma ação fisiológica de proteção de lesões cardíacas e disfunção miocárdica (Kehl, Iqbal et al. 2012) e tem ainda vários efeitos sistémicos, incluindo vasodilatação, aumento da excreção de sódio e inibição do sistema nervoso simpático (Levin, Gardner et al. 1998; Hall 2004).

Vários estudos demonstram a utilidade clínica do BNP e NT-pró-BNP no diagnóstico e tratamento de IC sugerindo que cada um destes péptidos pode ser utilizado na avaliação dos doentes (Kazanegra, Cheng et al. 2001; Maisel, Krishnaswamy et al. 2002). Ambos os péptidos são descritos como bons fatores preditivos da morbilidade e mortalidade associados à IC (Tsutamoto, Wada et al. 1997; de Lemos, Morrow et al. 2001), mesmo para valores inferiores a 100 pg/mL (valor utilizado para identificar IC) (Wang, Larson et al. 2004; Kragelund, Gronning et al. 2005). O BNP é, portanto, um marcador de alta sensibilidade e especificidade para a IC, uma vez que se correlaciona com a gravidade da doença (Masson, Latini et al. 2008). A sua concentração é normalmente determinada por imunoensaios (Loke, Squire et al. 2003). O BNP pode ainda ser útil na identificação de indivíduos assintomáticos com risco acentuado de desenvolvimento de IC (diabéticos, hipertensos, idosos) ou na avaliação de cardiotoxicidade induzida por quimioterapia anti-tumoral (Braunwald 2008).

1.6.2. Troponina

A troponina é um complexo de três proteínas que controlam a interação da actina e miosina que, por sua vez, promove a contração e relaxamento do músculo estriado (Daubert and Jeremias 2010). Existem três tipos de troponina, I, T, e C, mas apenas duas delas são expressas no músculo cardíaco, I e T, sendo, por esse motivo biomarcadores específicos para doenças do coração (Morrow, Cannon et al. 2007; Kehl, Iqbal et al. 2012). Uma concentração elevada de troponina cardíaca pode indicar a presença de lesões ou mesmo morte dos cardiomiócitos (Wu and Ford 1999).

A deteção de troponina circulante é rara na população em geral (Wallace, Abdullah et al. 2006) estando associada a instabilidade hemodinâmica, a disfunção sistólica ventricular esquerda e à diminuição da sobrevida (Fonarow and Horwich 2003; Xue, Yu et al. 2003). O aumento da concentração de troponina está, portanto, correlacionado com um prognóstico adverso na IC (Horwich, B. et al. 2003; Kociol, Pang et al. 2010). De acordo com Peacock *et al.* (2008) a elevação da concentração de troponina é um promissor marcador de prognóstico independente na IC e a sua deteção pode ser útil na estratificação dos doentes.

1.7. Biomarcadores inflamatórios

1.7.1. Proteína reativa C (PRC)

Um dos marcadores mais utilizados na avaliação de inflamação é a PRC (Pearson, Mensah et al. 2003; Kardys, Knetsch et al. 2006).

A PRC é um pentâmero com 115 KDa sintetizado maioritariamente no fígado pelos hepatócitos em resposta a estímulos de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) e o TNF- α (Packard, O'Reilly et al. 2000; Araujo, Lourenco et al. 2009) libertadas em diversas condições fisiopatológicas incluindo inflamação, infeção, lesões celulares e neoplasias (Pepys and Hirschfield 2003) (Figura 4).

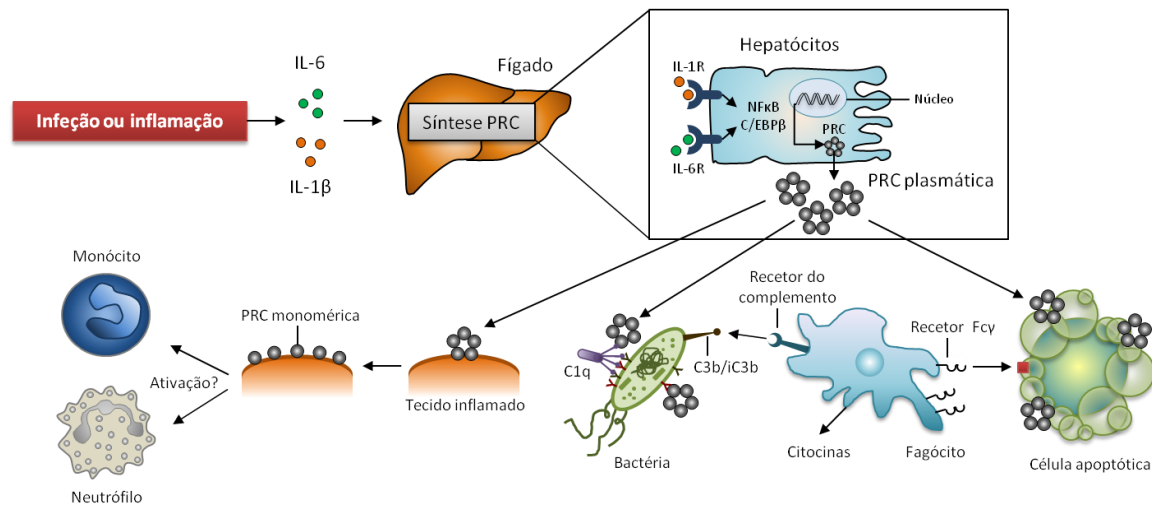


Figura 4 - Vias funcionais da PRC. Na resposta às citocinas como a IL-6, a expressão hepática da PRC aumenta. A PRC circulante promove uma série de ações como a opsonização de bactérias e células apoptóticas e a libertação de células fagocíticas de citocinas imunomoduladoras (adaptado de Rhodes, Furnrohr *et al.* 2011).

Um aumento da PRC é geralmente considerado um sinal de inflamação (Kushner, Rzewnicki et al. 2006). O grande interesse desta proteína na medicina cardiovascular desenvolveu-se após uma série de estudos epidemiológicos nos quais foi demonstrado que pequenas elevações na sua concentração sistémica são preditivas de diversos eventos cardiovasculares (Pirro, Bergeron et al. 2001; Jialal and Devaraj 2003; Braunwald 2008). No contexto específico de IC, elevadas concentrações desta proteína contribuem para o seu desenvolvimento e progressão (Backes, Howard et al. 2004; Kardys, Knetsch et al. 2006). Doentes com concentração de PRC superior a 3 mg/L (valor de referência para o diagnóstico de IC) apresentam um risco duplo de desenvolverem IC (Engstrom, Melander et al. 2009). De facto, existe uma associação entre a PRC e o estadió da IC (Alonso-Martínez, Llorente-Diez et al. 2002; Yin, Chen et al. 2004).

1.7.2. Leucócitos

Os glóbulos brancos têm alto valor preditivo na avaliação do risco cardiovascular estando o seu aumento geralmente relacionado com o agravamento da incidência de IC e da mortalidade (Cooper, Exner et al. 1999; Horne, Anderson et al. 2005; Duffy, Gurm et al. 2006). Os monócitos e linfócitos participam ativamente na formação de ateromas nas placas das artérias coronárias (Libby 2003). Os neutrófilos estão envolvidos na formação de agregados de plaquetas e leucócitos, contribuindo para a exacerbação das lesões em síndromes coronárias agudas. Por outro lado, a linfocitopenia também está independentemente associada ao aumento da mortalidade em doentes com IC (Huehnergath, Mozaffarian et al. 2005; Rudiger, Burckhardt et al. 2006). Foi postulado que os potenciais mecanismos para linfocitopenia observada em doentes com IC incluem regulação negativa da proliferação e diferenciação leucocitária, ativação neuro-hormonal e apoptose de linfócitos (Sciarretta, Ferrucci et al. 2007; Uthamalingam, Patvardhan et al. 2011).

Recentemente, o rácio neutrófilos/linfócitos (N/L) emergiu como marcador inflamatório eficaz, estando o seu aumento relacionado com uma maior mortalidade em doentes com IC crónica. (Cooper, Exner et al. 1999; Tamhane, Aneja et al. 2008).

1.7.3. Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína, sintetizada durante a diferenciação mielóide, expressa abundantemente em células polimorfonucleares (PMNs) e secretada durante a sua ativação (Nauseef 1988; Nauseef, Olsson et al. 1988; Malech and Nauseef 1997). É uma enzima simultaneamente relacionada com a inflamação e o stresse oxidativo, é libertada por leucócitos em condições inflamatórias e catalisa a formação de ROS (Klebanoff 2005) (Figura 5). Esta proteína é armazenada em grânulos primários até ser libertada pela ativação leucocitária e desgranulação (Nauseef 1988; Malech and Nauseef 1997) catalisando depois a formação de diversas espécies reativas incluindo o ácido hipocloroso, com papel preponderante na defesa contra microrganismos, cloraminas, radicais tirosilo e dióxido de azoto que oxidam proteínas e lípidos. A MPO parece funcionar como um catalisador enzimático de modificações oxidativas de lipoproteínas na parede arterial (Holvoet 1998). A oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) facilita a progressão da aterogénese pela deposição de colesterol, principalmente no interior de macrófagos, formando as células espumosas. Este processo resulta também no recrutamento de células inflamatórias, como monócitos e linfócitos, pelas propriedades quimiotáticas da LDL oxidada (Malech and Nauseef 1997;

Stocker and Keaney 2004; Schindhelm, van der Zwan et al. 2009). Assim, a MPO está envolvida nos vários estádios de aterogénese e disfunção endotelial participando na génese e progressão de doenças cardiovasculares. A sua quantificação é útil para a predição do risco de vários eventos cardíacos adversos (Baldus, Heeschen et al. 2003; Brennan, Penn et al. 2003). A utilização da MPO como biomarcador promoveu, portanto, uma melhoria na estratificação do risco cardiovascular na prática clínica. A imunodeteção é um dos métodos mais utilizados para a quantificação de MPO em amostras de sangue (Nauseef, Olsson et al. 1988).

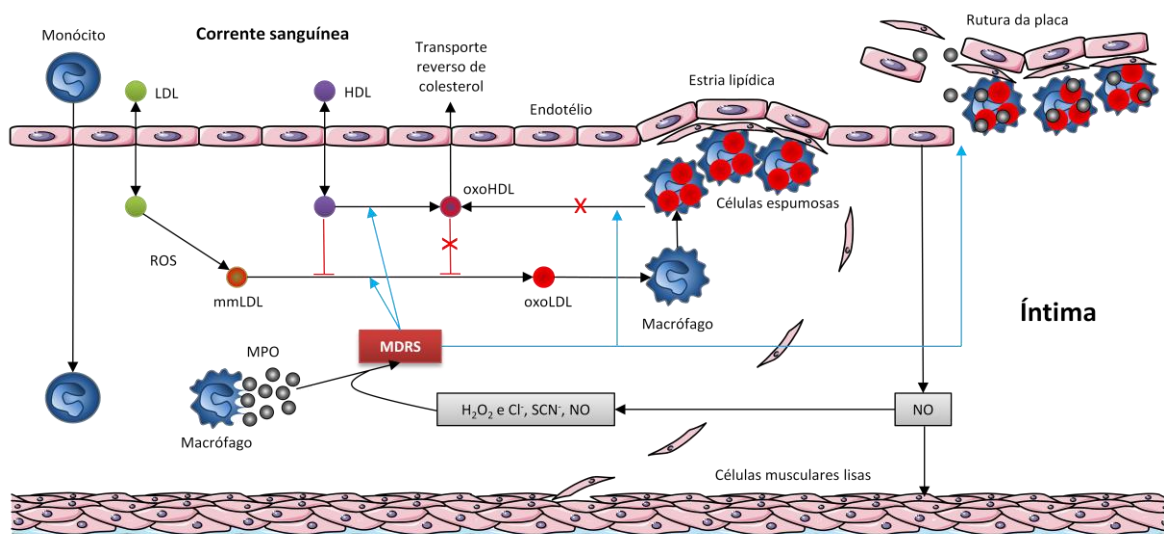


Figura 5 - Efeitos da MPO nos vasos sanguíneos. A MPO é libertada pelos macrófagos em estados inflamatórios e catalisa a formação de espécies reativas derivadas da MPO (MDRS) usando o cloro (Cl^-), o tiocianato (SCN^-), o monóxido de azoto (NO) como substratos e o H_2O_2 como co-substrato. O consumo de NO pela MPO pode prejudicar a vasodilatação dependente do endotélio. As MDRS promovem também a aterosclerose por vários mecanismos: exacerbam a oxidação de partículas de LDL (mmLDL, LDL minimamente modificado) iniciada por outras ROS, formando o LDL oxidado (oxoLDL); o oxoLDL é depois fagocitado pelos macrófagos, originando as células espumosas que se acumulam junto ao endotélio formando a placa de ateroma; as MDRS oxidam ainda o HDL formando HDL oxidado (oxoHDL) o que diminui o efeito protetor do HDL e inibe o transporte reverso de colesterol. As MDRS podem ainda contribuir para a rutura das placas de ateroma por enfraquecimento da camada fibrosa. (adaptado de Schindhelm, van der Zwan et al. 2009).

Relativamente à atividade da MPO, sabe-se que esta desempenha um papel preponderante no desenvolvimento de várias patologias como a doença renal crónica (Sela, Shurtz-Swirski et al. 2005) e a doença de Chagas (Dhiman, Estrada-Franco et al. 2009). O aumento da expressão e da atividade da MPO está relacionado com o agravamento da inflamação, stresse oxidativo e disfunção endotelial (Stenvinkel, Rodriguez-Ayala et al. 2006). A oxidação e nitratação proteica, provocadas pelo aumento da atividade da MPO, são uma das principais modificações causadoras de doença (Dhiman, Estrada-Franco et al. 2009). É de notar que a atividade da MPO é independente da quantidade de neutrófilos (Kitahashi, Hino et al. 2000). Estes dados sugerem que a atividade da MPO possa ser usada como um novo biomarcador de inflamação e stresse oxidativo.

1.8. Biomarcadores de stresse oxidativo

O processo de quantificação direta de ROS é dificultado pela instabilidade da maioria destas moléculas. Assim, a avaliação de stresse oxidativo em patologias humanas tem recaído fundamentalmente na quantificação de marcadores indiretos como a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, os produtos da peroxidação lipídica, enzimas pró-oxidantes e a capacidade antioxidante total ou a concentração de antioxidantes específicos no plasma e/ou urina (Kameda, Matsunaga et al. 2003; Polidori, Pratico et al. 2004).

1.8.1. Ácido úrico (AU)

Vários estudos sugerem que o ácido úrico (AU), o produto final do catabolismo das purinas pela xantina oxidorreductase, poderá ser útil como marcador metabólico, hemodinâmico e funcional de IC, e ser um fator preditivo válido de sobrevida nos doentes com esta condição patológica (Duan and Ling 2008; Harzand, Tamariz et al. 2012).

A xantina oxidorreductase possui duas formas interconvertíveis, a xantina desidrogenase, que utiliza preferencialmente o NAD^+ como recetor de eletrões e a xantina oxídase (XO), que reduz o oxigénio molecular e é a forma enzimática predominante em condições de stresse oxidativo. A atividade da XO está associada à formação de uma molécula de superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e de uma molécula de H_2O_2 por cada unidade de AU produzida (Baldus, Koster et al. 2005) (Sousa, Afonso et al. 2012). O AU é um potente antioxidante havendo autores que consideram que o aumento da sua concentração sistémica funciona como um mecanismo protetor contra o stresse oxidativo (Lippi, Montagnana et al. 2008). No entanto, sabe-se também que o AU pode exercer efeitos pró-oxidantes e pró-inflamatórios. Dados recentes sugerem uma ação conjunta da via da XO e do AU na patogénese de IC. A elevação da atividade enzimática da XO contribui para o aumento do stresse oxidativo, disfunção endotelial e redução da função do miocárdio (Berry and Hare 2004; Kojima, Sakamoto et al. 2005), processos estes, associados à patogénese de IC (Baldus, Koster et al. 2005; Zimmet and Hare 2006; Duan and Ling 2008).

O aumento da concentração de AU é frequentemente observado em doentes com IC (Leyva, Anker et al. 1998) existindo evidência que suporta a possibilidade de o AU acrescentar informação prognóstica importante em combinação com outros marcadores de função cardíaca em doentes com IC (Duan and Ling 2008).

1.8.2. Capacidade antioxidante total (*total antioxidant status*, TAS)

Como já foi referido, o stresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de inúmeras doenças, incluindo a IC (Ungvari, Gupte et al. 2005; Takimoto and Kass 2007). É também sabido que todos os organismos aeróbios possuem defesas antioxidantes de forma a contrariar os efeitos prejudiciais causados pelo aumento excessivo de ROS (Sies 1993). No plasma existe um grande número de antioxidantes hidro- e lipossolúveis e a cooperação destes compostos providencia proteção contra os ataques das ROS (Ghiselli, Serafini et al. 2000; Sousa, Afonso et al. 2012). A atividade combinada destes antioxidantes pode ser avaliada no plasma, soro ou urina por diversos ensaios. O ensaio de quantificação da TAS, por exemplo, avalia a capacidade antioxidante com base na inibição de uma reação de oxidação pela amostra testada. Quando a concentração de ROS aumenta excessivamente, é de esperar que ocorra um maior consumo de antioxidantes endógenos com consequente redução da sua concentração. A TAS pode então ser usada como um marcador indireto do stresse oxidativo (Sousa, Afonso et al. 2012). A redução da TAS contribui para o desenvolvimento de muitas doenças, como a diabetes e doenças coronárias (Mahmood, Naseem et al. 2011).

A quantificação da TAS parece ser mais representativa do balanço entre espécies oxidantes e antioxidantes do que a avaliação isolada de cada antioxidante (Ghiselli, Serafini et al. 2000). Contudo, tem algumas limitações, tais como a fraca correlação com outros ensaios de avaliação da capacidade antioxidante (*Ferric Reducing Ability of Plasma*, FRAP; *Oxygen radical Absorbance Capacity*, ORAC; *Total Radical Trapping Parameter*, TRAP) e o facto de o AU contribuir para cerca de 50% da TAS (Young and Woodside 2001; Sousa, Afonso et al. 2012).

1.8.3. Isoprostanos (Isop)

Os lípidos são um dos alvos mais importantes para o ataque dos radicais livres em condições de stresse oxidativo. Os Isop são produtos da peroxidação lipídica, uma causa importante no desenvolvimento de várias doenças, incluindo cardiovasculares e neurológicas (Mallat, Philip et al. 1998; Basu 2004; Montuschi, Barnes et al. 2007; Basu 2010), sendo por isso considerados biomarcadores de stresse oxidativo.

Estes compostos têm potentes atividades biológicas com relevância no contexto de patologias cardiovasculares, tais como vasoconstrição, mitogénese e hipertrofia cardíaca, tendo sido descritas várias associações entres estas moléculas e condições inflamatórias graves (Basu 2010; Ting and Khasawneh 2010).

A quantificação de Isop em tecidos e fluidos biológicos, incluindo plasma e urina, tem sido sugerida para quantificar lesões oxidativas. Estas moléculas são quimicamente estáveis e detetáveis nas matrizes anteriormente referidas (Kadiiska, Gladen et al. 2005; Milne, Yin et al. 2011) providenciando uma importante ferramenta de avaliação do stresse oxidativo na patogénese de várias doenças (Montuschi, Barnes et al. 2007). Diversos estudos descreveram uma associação entre o aumento dos Isop e a IC e propõem a quantificação de Isop como um método não invasivo de investigação bioquímica na IC (Cracowski, Tremel et al. 2000).

1.8.4. H_2O_2

O H_2O_2 tem sido apontado como uma importante molécula de sinalização envolvida na alteração de vias metabólicas encontrando-se assim implicada na etiologia de várias doenças. Foi já demonstrado o papel do H_2O_2 na patogénese da aterosclerose uma vez que medeia a expressão de proteínas inflamatórias e aumenta a interação das plaquetas com o endotélio, facilitando assim a inflamação (Siflinger-Birnboim and Malik 1996; Cai 2005). É também sabido que as lesões causadas pelas espécies oxidantes produzidas pela MPO são dependentes do H_2O_2 dado que este é um substrato para esta enzima (Zhang, Yang et al. 2003; Malle, Furtmuller et al. 2007). Vários estudos têm ainda sublinhado o papel do H_2O_2 na fisiopatologia da hipertensão arterial devido aos seus efeitos na estrutura e reatividade vascular (Cai 2005; Sousa, Pinho et al. 2008) e na função renal (Sousa, Oliveira et al. 2012). No entanto, ainda não foi investigado o seu papel na IC. Recentemente, foi sugerido que a excreção urinária de H_2O_2 pode funcionar como um biomarcador de stresse oxidativo renal (Jin, Hu et al. 2009) o que poderá ter interesse na avaliação de doentes com síndrome cardiorenal, presente em muitos doentes com IC e caracterizada pelo agravamento concomitante das funções cardíaca e renal. Deste modo, a avaliação do H_2O_2 pode acrescentar informação importante para o prognóstico e melhorar a estratificação do risco.

1.9. Resolução da inflamação

A reação inflamatória aguda integra um conjunto de mecanismos de defesa e reparação/cicatrização que, quando mantidos cronicamente, podem ser causa de patologia (Majno and Joris 2004). As células fagocíticas do sistema imune inato, principalmente neutrófilos, são recrutadas por gradientes quimiotáticos infiltrando-se na lesão por diapedese (Figura 6A). Alguns destes fatores quimiotáticos são mediadores lipídicos endógenos, tais como os leucotrienos (Luster, Alon et al. 2005).

A resolução da inflamação pode ser descrita como a redução ou remoção de leucócitos e células apoptóticas, ou seus resíduos, dos tecidos inflamados de forma a repor a homeostasia, limitar as lesões teciduais e minimizar a inflamação (Maderna and Godson 2009). Depende de ações biológicas de mediadores anti-inflamatórios e de pró-resolução. Deste modo, qualquer falha neste processo pode levar à inflamação crónica com possível destruição do tecido, fibrose e a uma eventual falência do órgão (Serhan 2004; Bannenberg 2005; Maderna and Godson 2009).

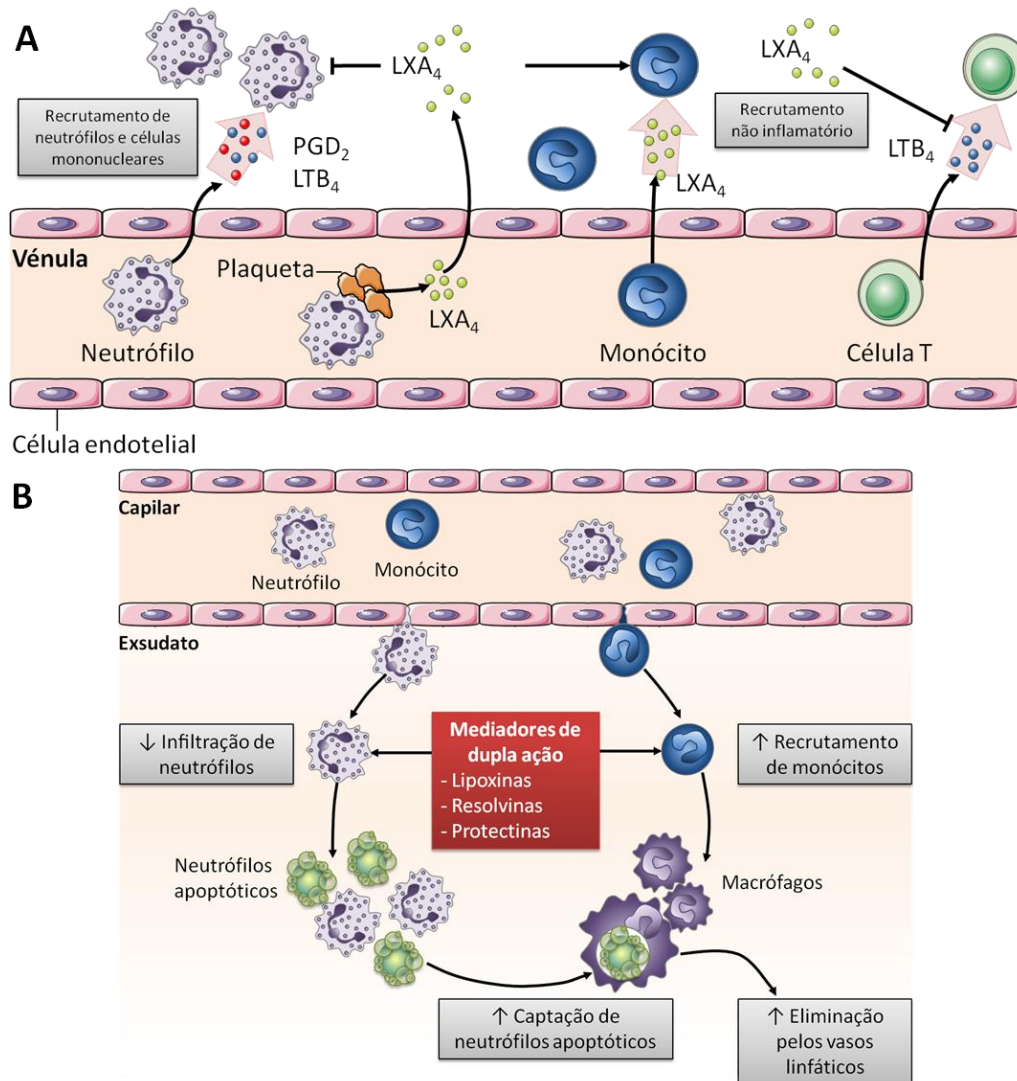


Figura 6 - A) Efeitos da LXA₄ no recrutamento de neutrófilos e células mononucleares – Os gradientes quimiotáticos endógenos e exógenos estimulam o recrutamento de neutrófilos que é amplificado pela produção local de LTB₄. Durante a progressão de eventos inflamatórios nos tecidos, as interações entre plaquetas e leucócitos induzem a formação de LXA₄ e LXB₄. Estas lipoxinas inibem o recrutamento de neutrófilos e estimulam a infiltração não-inflamatória de monócitos. **B)** Dupla ação, anti-inflamatória e de pró-resolução, de lipoxinas, resolvinas e protectinas (adaptado de Serhan, Chiang *et al.* 2008).

Inicialmente este processo foi descrito como sendo passivo e resultante de uma dissipação de fatores pró-inflamatórios. Contudo, estudos recentes indicam que a resolução é um processo ativo, tanto a nível bioquímico como metabólico (Serhan 2004;

Bannenberg 2005). É iniciado por vias celulares especializadas, que sintetizam localmente mediadores lipídicos anti-inflamatórios e de pró-resolução, como lipoxinas (LXs), resolvinas e protectinas (Serhan 2000; Levy, Clish et al. 2001) (Figura 3). Estas moléculas estimulam e aceleram a resolução da inflamação por mecanismos multifatoriais, promovendo a homeostasia (Figura 6B).

As lipoxinas, resolvinas e protectinas são compostos anti-inflamatórios que impedem a entrada de leucócitos nos exsudatos e contrariam os efeitos da sinalização inflamatória (Das 2011a) (Figura 7). A interação dos leucócitos com outras células possibilita a formação destes mediadores lipídicos (Serhan, Yacoubian et al. 2008), que regulam assim a duração e magnitude da inflamação (Das 2011b).

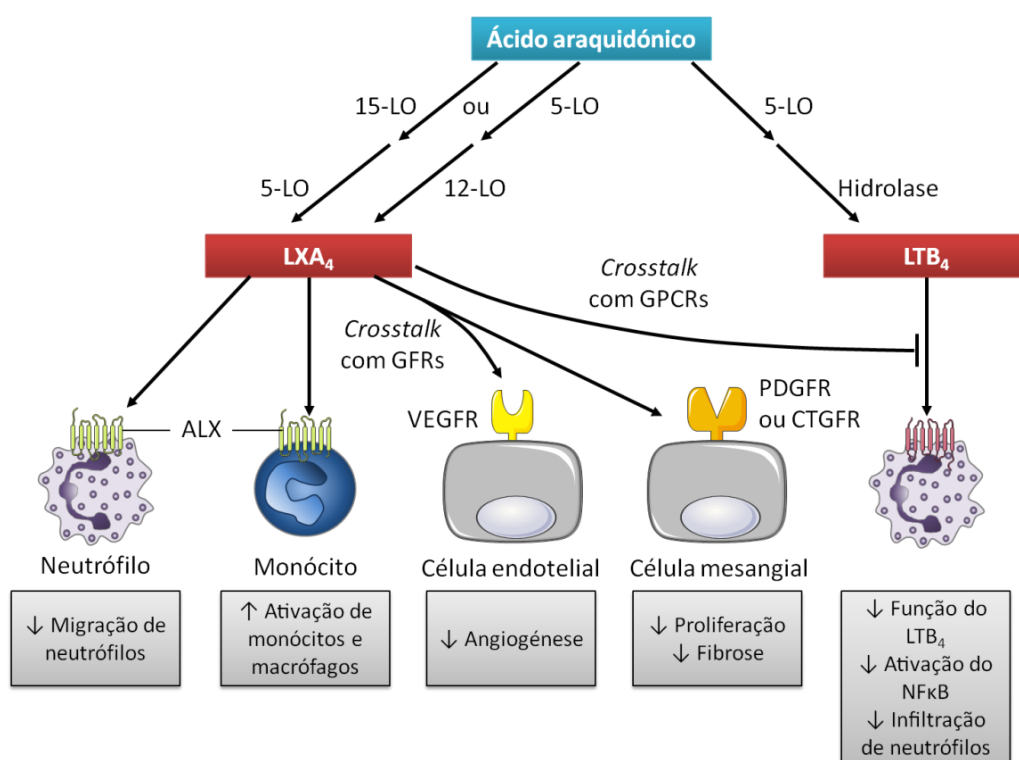


Figura 7 - Mecanismos de ação da LXA₄. A generalidade dos efeitos da LXA₄ *in vivo* é possivelmente mediada pela sua interação com recetores acoplados a proteínas G (GPCRs) e com recetores de fatores de crescimento. A ativação do recetor da LXA₄ (ALX) resulta em eventos de sinalização específicos, dependentes do tipo de células envolvidas, que inibem a migração de neutrófilos e estimulam a ativação de monócitos e macrófagos. A inibição indireta, mediada pela interação com outros GPCRs, tais como o BLT₁ (recetor do LTB₄) e recetores de fatores de crescimento, como o VEGFR (recetor do fator de crescimento do endotélio vascular) expresso nas células endoteliais, o PDGFR (recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas) e o CTGFR (recetor do fator de crescimento do tecido conjuntivo) expressos nas células mesangiais, reduz a angiogénese, a proliferação das células mesangiais e a fibrose (adaptado de Serhan, Chiang et al. 2008).

2. Lipoxinas

As lipoxinas (LX) foram os primeiros mediadores eicosanóides reconhecidos com dupla atividade: anti-inflamatória e de pró-resolução (Godson, Mitchell et al. 2000; Serhan 2005). Serhan *et al.* (1984) descreveu pela primeira vez estes compostos oxigenados

derivados do ácido araquidónico (AA) numa suspensão de leucócitos humanos. Os mais abundantes foram caracterizados como ácido 5,6,15-*L*-trihidroxi-7,9,11,13-eicosatetraenoico (lipoxina A₄, LXA₄) e ácido 5D,14,15-*L*-trihidroxi-6,8,10,12-eicosatetraenoico (lipoxina B₄, LXB₄).

A concentração de LXs presentes em matrizes biológicas, nomeadamente sangue e urina, reflete a capacidade de biossíntese destes compostos, permitindo distinguir o estado de progressão de doenças que envolvem inflamação (Serhan 2005).

2.1. Biossíntese de lipoxinas A₄ e B₄

As LXs são produzidas por um sistema transcelular, i.e. a sua síntese implica a ação de enzimas produzidas em diferentes tipos celulares (Ryan and Godson 2010).

Existem duas vias principais de biossíntese de LXs no Homem (Figura 8). A primeira via biossintética envolve a oxigenação do AA no C-15 pela 15-lipoxigenase (15-LO) existente nos eosinófilos, monócitos ou células epiteliais, originando o ácido 15-hidroperoxieicosatetranóico (15S-HPETE). Na sequência da secreção, o 15S-HPETE é captado pelas células polimorfonucleares (PMNs) ou monócitos e é rapidamente convertido em 5,6-epoxitetraeteno pela 5-lipoxigenase (5-LO), que por sua vez é hidrolisado nestas mesmas células pela LXA₄ ou LXB₄ hidrolase originando LXA₄ ou LXB₄ ativas. Este processo, curiosamente, reduz a formação de LTs, que requerem a 5-LO para a conversão do AA em leucotrieno A₄ (LTA₄) (Serhan 1989; Claria and Serhan 1995; Serhan 1995).

A segunda maior via de biossíntese de LXs é dependente da formação de LTA₄, e envolve a interação entre plaquetas e leucócitos. A 5-LO leucocitária converte o AA em LTA₄ como já foi referido, e este é libertado, captado pelas plaquetas e subsequentemente transformado em LXA₄ ou LXB₄ pela ação da LX-sintetase, 12-LO (Serhan and Sheppard 1990; Romano and Serhan 1992).

2.2. Biossíntese de 15-epi-lipoxinas

É de especial interesse o facto de a aspirina (ácido acetilsalicílico, AAS) ser capaz de desencadear a formação de mediadores lipídicos específicos, mediante uma via biossintética única que leva à formação de 15-epi-LXA₄, usualmente denominada por *aspirin-triggered-lipoxin* (ATL) (Claria and Serhan 1995) (Figura 8).

Esta é uma terceira via de formação de LXs, que ocorre após a administração exógena de AAS mas não de outros anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) convencionais. A acetilação da COX-2 nas células endoteliais e outros tipos celulares,

altera o seu perfil de atividade, promovendo a conversão do AA no Ácido 15*R*-hidroxieicosatetraenóico (15*R*-HETE) ao invés da sua transformação em PGG₂ (Claria and Serhan 1995; Chiang, Bermudez et al. 2004; Stables and Gilroy 2011). O 15*R*-HETE é depois metabolizado num processo transcelular nos leucócitos pela 5-LO, formando um epímero da LX, a 15-epi-LXA₄, que possui um grupo álcool no C-15 na configuração *R* ao invés da configuração 15*S* nativa (Paul-Clark, van Cao et al. 2004; Stables and Gilroy 2011).

É sabido que o tratamento com doses baixas de AAS confere proteção cardiovascular mediada pela inibição da agregação plaquetar. No entanto, a produção de 15-epi-LXA₄ induzida pela AAS poderá também contribuir para os efeitos benéficos deste fármaco. A 15-epi-LXA₄ é então um potencial biomarcador da resposta anti-inflamatória mediada por leucócitos e outras células, em doentes tratados com AAS (Chiang, Bermudez et al. 2004; Serhan 2005).

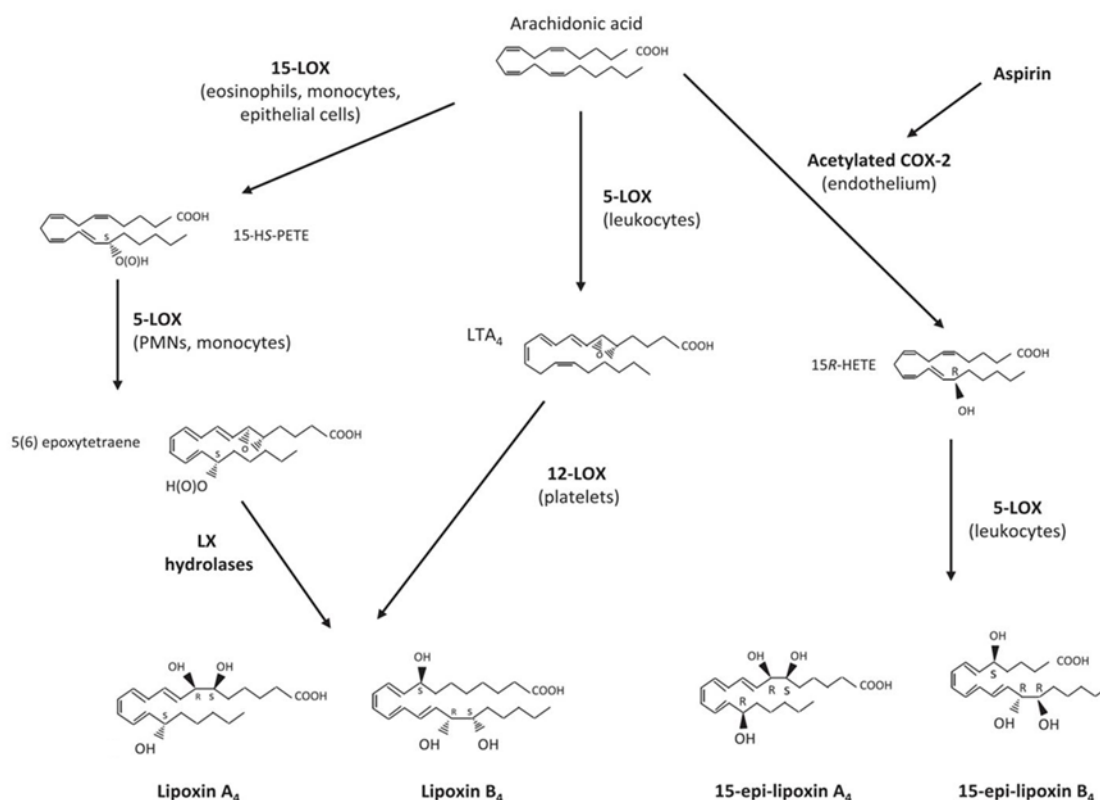


Figura 8 - Metabolismo de lipoxinas (LXA₄, LXB₄, 15-epi-LXA₄ e 15-epi-LXB₄) (Stables and Gilroy 2011).

2.3. Recetor de lipoxinas

As ações das LXs e ATLs estão dependentes da ativação de um recetor específico, formado por 7 domínios transmembranares que pertence à família dos recetores quimiotáticos (Fiore, Maddox et al. 1994; Takano 1997). Este recetor, membro

dos recetores formil-peptídicos (FPR) é designado por FPR2/ALX e apresenta uma expressão elevada nas células de resposta imune e inflamatória, nomeadamente nas PMNs, monócitos, linfócitos e células endoteliais. Para além das LXs e ATLs, este recetor é também reconhecido por outros peptídeos e mediadores lipídicos o que justifica a existência de outras respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias mediadas pela sua ativação. A expressão do ALX é induzida por citocinas, estando aumentada em casos de inflamação (Romano, Recchia et al. 2007; Dufton, Hannon et al. 2010).

Embora se conheçam alguns mecanismos, muitas das vias de sinalização intracelulares desencadeadas por estes recetores ainda permanecem por elucidar. Contudo, alguns estudos indicam que as diferentes afinidades dos lípidos e pequenos peptídeos para este recetor, assim como a existência de locais distintos de interação do recetor com estas moléculas, condicionam uma ativação diferencial de segundos mensageiros e, conseqüentemente, de diferentes vias de sinalização a jusante (Chiang, Arita et al. 2005; Chiang 2006; Romano, Recchia et al. 2007).

2.4. Ação das lipoxinas

As LXs desempenham importantes atividades fisiológicas e patológicas (Serhan 1994). Estes compostos inibem a infiltração de células PMNs, como por exemplo os neutrófilos, e atuam ainda em muitos outros tipos celulares, incluindo células neuronais, epiteliais e endoteliais (Takano, Clish et al. 1998; Chiang 2006).

Na Tabela 4 estão descritas as principais as ações anti-inflamatórias e de pró-resolução das lipoxinas e ATLs *in-vivo*.

Estes múltiplos mecanismos celulares e locais de ação contribuem para a eficácia das LXs na redução da inflamação e no retardamento da progressão de várias doenças (Serhan 2006; Schwab, Chiang et al. 2007). No entanto apesar da sua potencial relevância clínica ainda não existem estudos sobre o papel destas moléculas na patogénese e progressão da IC.

2.5. Inativação metabólica de lipoxinas

As LXs são produzidas em resposta a estímulos, atuam localmente e são rapidamente inativadas por enzimas metabólicas. A principal via de inativação de LXs passa pela sua desidrogenação nos monócitos, que convertem LXA₄ em 15-oxo-LXA₄, seguida de uma redução específica da ligação dupla adjacente ao grupo cetona (Serhan, Maddox et al. 1995). A 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (15-PGDH) catalisa a oxidação da LXA₄ a 15-oxo-LXA₄.

Tabela 4 - Principais ações das LXA₄ e 15-epi-LXA₄ (Serhan, Chiang et al. 2008).

Célula alvo	Ações
Leucócitos	<ul style="list-style-type: none"> • Diminui a expressão da CD11b/CD18 • Previne a eliminação de L-selectina da superfície de leucócitos • Reduz a produção de peroxinitrito em neutrófilos, monócitos e linfócitos
Neutrófilos	<ul style="list-style-type: none"> • Bloqueia a quimiotaxia, a adesão e a transmigração • Bloqueia interações celulares neutrófilos-epitélio e neutrófilos-endotélio • Bloqueia a produção do anião superóxido • Reduz a expressão de CD11b/CD18 e a formação de InsP3 • Inibe a produção de peroxinitrito • Atenua a acumulação de AP1 e NF-κB, inibe a expressão do gene IL8
Eosinófilos	<ul style="list-style-type: none"> • Bloqueia a migração e quimiotaxia <i>in vivo</i> • Inibe a produção de eotaxina e IL-5
Monócitos	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula a quimiotaxia e adesão à laminina, sem aumentar a cito toxicidade • Inibe a produção de peroxinitrito
Macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula a fagocitose de neutrófilos apoptóticos
Células T	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe a secreção de TNF bloqueando a ativação da ERK • Aumenta a expressão de CCR5
Células dendríticas	<ul style="list-style-type: none"> • Bloqueia a produção de IL-12
Células epiteliais	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe a expressão e a liberação de TNF induzida pela IL-8 nos enterócitos
Células endoteliais	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula a formação de PKC dependente da prostaciclina • Bloqueia a produção de espécies reativas do oxigênio • Inibe a migração de células endoteliais induzida pelo VEGF
Fibroblastos	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe a produção de IL-1β induzida pela IL-6, IL-8 e de MMP3 • Inibe a proliferação induzida pela CTGF
Hepatócitos	<ul style="list-style-type: none"> • Reduz a expressão do PPARα e CINC1
Células mesangiais	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe a proliferação induzida pelo leucotrieno D4 • Inibe a produção de quimiocinas induzidas pela CTGF
Células estaminais neuronais	<ul style="list-style-type: none"> • Atenua o crescimento celular
Astrócitos	<ul style="list-style-type: none"> • Inibe a ativação da ERK e JNK

Este composto é biologicamente inativo e é ainda convertido em 13,14-dihidro-oxo-LXA₄ pela ação de uma oxidoredutase eicosanoide (EOR). A 15-PGDH reduz ainda o grupo 15-oxo em 13,14-dihidro-LXA₄ o que revela uma capacidade catalítica adicional para esta enzima (Clish, Levy et al. 2000). A LXB₄ pode também ser desidrogenada pela 15-PGDH no C-5 produzindo 5-oxo-LXB₄, compartilhando de seguida a mesma via comum de inativação da LXA₄ (Maddox, Colgan et al. 1998) (Figura 9).

Serhan *et al.* (1995) demonstrou que as ATLs, quando comparadas com a LXA₄, são convertidas nos seus 15-oxo-metabólitos numa cinética mais lenta pela 15-PDGH, indicando a estéreo-especificidade desta enzima. As ATLs apresentam assim um tempo de semivida biológica maior, tendo por isso uma maior duração de ação que a LXA₄ (Serhan, Maddox et al. 1995; Maddox 1997; Clish 1999)

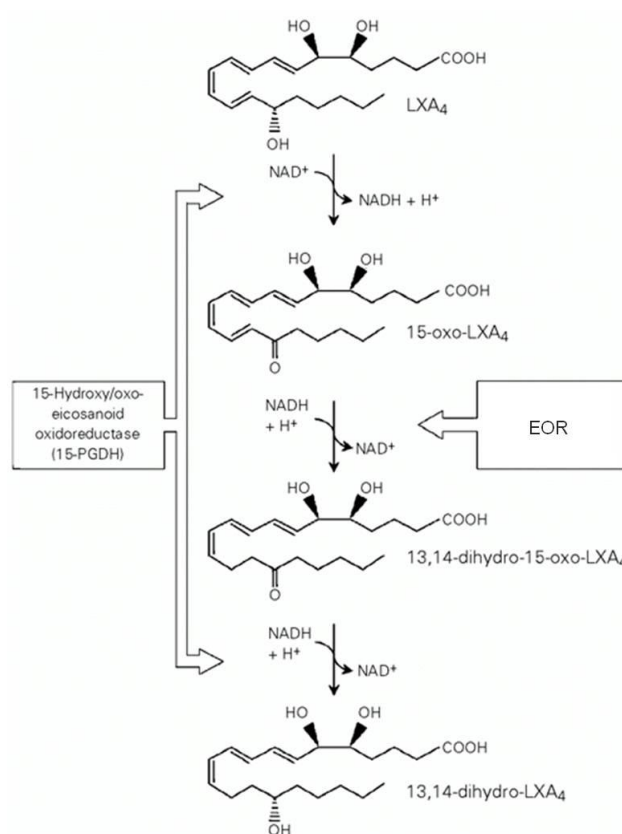


Figura 9 - Representação da inativação enzimática de LXA₄. O primeiro passo é a desidrogenação do grupo 15-hidroxilo catalisada pela 15-PGDH, seguido da redução da ligação dupla 13-14 pela EOR (Chiang, Arita et al. 2005).

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

III - OBJETIVOS

Pensa-se que a deterioração do funcionamento cardíaco poderá resultar de um decréscimo da formação de LXs, com consequente aumento da ativação leucocitária, inflamação e fibrose (Das 2011b). No entanto, apesar do interesse crescente nos mecanismos de proteção mediados pelas LXA₄ e 15-epi-LXA₄ ainda não há estudos sobre o seu papel na patogénese e progressão da IC.

Este projeto pretendeu avaliar a relação entre a biodisponibilidade de LXs e o estadio de IC, tendo sido quantificadas a concentração plasmática e urinária de LXA₄ e de 15-epi-LXA₄ em doentes com IC crónica, e a correlação destes parâmetros com alguns biomarcadores específicos de IC, inflamação e stresse oxidativo. Analisou-se ainda o impacto da terapêutica com AAS na concentração de 15-epi-LXA₄, LXA₄ e restantes marcadores.

CAPÍTULO IV

MATERIAL E MÉTODOS

IV - MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia, e foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de São João. Foram selecionados 34 doentes com ICC (classes funcionais NYHA I a IV) seguidos na consulta de IC do Hospital de S. João, entre Setembro de 2009 e Novembro de 2011. No dia da convocatória, os doentes foram avaliados clinicamente e procedeu-se à colheita de sangue venoso em tubos contendo citrato, heparina ou EDTA, ou em tubos sem anticoagulante, consoante os parâmetros a analisar. A urina de 24h foi recolhida pelos doentes no dia anterior e entregue no dia da convocatória.

1. Processamento das amostras e análise de marcadores de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo.

1.1. Processamento do sangue e urina

O processamento das amostras para análise de BNP, troponina, PRC, AU, creatinina e contagem de leucócitos foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de S. João.

As amostras utilizadas para avaliar os restantes parâmetros foram processadas no Departamento de Farmacologia e Terapêutica, FMUP. Para a quantificação da MPO (concentração e atividade), lipoxinas e capacidade antioxidante total do plasma (TAS), procedeu-se à centrifugação do sangue num período máximo de 2h após a colheita e o plasma obtido foi repartido por alíquotas para a avaliação dos diferentes marcadores. A urina de 24h foi também distribuída por alíquotas. Para evitar a oxidação ulterior das amostras destinadas à avaliação de Isop, adicionou-se o butil-hidroxitolueno (BHT 0,005%). Todas as amostras foram armazenadas a - 80°C.

1.2. Marcadores de IC: BNP e troponina

As concentrações plasmáticas de BNP e troponina foram analisadas por ensaios imunoenzimáticos no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de S. João.

1.3. Marcadores inflamatórios

1.3.1. Proteína reativa C

A concentração plasmática de PRC foi analisada por nefelometria no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de S. João.

1.3.2. Contagem de leucócitos totais e contagem diferencial de leucócitos

As contagens de leucócitos no sangue foram efetuadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de S. João.

1.3.3. Concentração da MPO

A concentração plasmática de MPO foi avaliada por um método imunoenzimático, recorrendo a um *kit* ELISA comercial (Bioxytech MPO-EIA, Oxis Reseach). Neste ensaio, os plasmas e os padrões de MPO foram aplicados numa placa revestida com um anticorpo monoclonal que reage com uma determinada sequência antigénica da molécula de MPO. Posteriormente, adicionou-se uma solução contendo outro anticorpo monoclonal anti-MPO, dirigido a outra sequência antigénica da enzima e associado a uma peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP). As amostras de plasma reagiram sequencialmente com os dois anticorpos, o que resultou num aprisionamento das moléculas de MPO entre o anticorpo da fase sólida e o anticorpo ligado à enzima. Após incubação, os poços foram lavados com tampão para remover anticorpos não ligados. O TMB, um substrato para a HRP, foi posteriormente adicionado à placa, causando o desenvolvimento de cor azul. Esta reação foi parada pela adição de uma solução ácida que alterou a cor para amarelo. A absorvância foi então lida por espectrofotometria a 450 nm. A concentração de MPO determinada por este ensaio é diretamente proporcional à intensidade de cor das amostras.

1.3.4. Atividade da MPO

A atividade da MPO foi avaliada no plasma por um ensaio espectrofotométrico, com base nas metodologias descritas por Suzuki *et al.* (1983) e Andrews & Krinsky (1982). Resumidamente, a atividade da MPO foi determinada pela monitorização da oxidação da tetrametilbenzidina (TMB) a 655 nm ($\epsilon = 18,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante 3 minutos, a 37°C. Adicionou-se 50 μl de TMB (7,5 mM em dimetilsulfóxido) a 50 μl de

plasma. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 50 µl de H₂O₂ (1,5 mM, em tampão fosfato, Na₂HPO₄·2H₂O, 50 mM, pH 5,4). Uma unidade de atividade de MPO corresponde à quantidade de enzima que consome 1 µmol de H₂O₂ por minuto a 37°C. A atividade da MPO foi ainda normalizada para a concentração de MPO (mg/ml) presente em cada amostra, sendo os valores expressos em µmol/min/mg de MPO.

1.3.5. Lipoxinas

As LXs podem ser obtidas de matrizes de amostras complexas através de uma variedade de métodos de extração e cromatográficos (Levy, Gronert et al. 1999). A carga do grupo carboxilato das LXs pode ser modificada, alterando a afinidade do composto para a fase estacionária ou o coeficiente de partição para a fase líquida.

1.3.5.1. Extração

A extração de LXA₄ e 15-epi-LXA₄ do plasma foi realizada segundo o protocolo descrito nas instruções do *kit* ELISA e foi iniciada pela adição de 200 µl de metanol a 100 µl de amostra, seguida de uma diluição com 1,5 ml de água, e acidificação com HCl até um pH de 3.5. Após o pré-acondicionamento da coluna C₁₈ Sep-Pack light (Waters Corporation, Milan, Italy) com 2 ml de metanol e 2 ml de água, foi aplicada a amostra e procedeu-se a uma lavagem com 5 ml de água e 5 ml de hexano. As lipoxinas foram eluídas com 2 ml de metil formato, evaporado posteriormente numa corrente de N₂.

Para a extração de lipoxinas da urina seguiu-se o protocolo experimental descrito por Romano *et al.* (2002). As amostras foram inicialmente diluídas com metanol e colocadas a -80°C durante 3 horas. Após centrifugação, o sobrenadante foi evaporado numa centrífuga com vácuo. O resíduo seco foi ressuscitado em metanol e água desionizada (dH₂O), acidificado a um pH de 3.5 com HCl e aplicado numa coluna C₁₈ Sep-Pak Classic (Waters Corporation, Milan, Italy), previamente ativada com metanol e dH₂O. Em seguida, a coluna foi neutralizada com 20 ml de dH₂O e lavada com 10 ml de hexano. Posteriormente, efetuou-se a eluição da amostra com 5 ml hexano/acetato-etilo (40/60; v:v) e a sua secagem num concentrador de amostras (Stuart, UK). O resíduo seco foi novamente ressuscitado em 200 µl de tolueno/acetato-etilo/metanol (60/40/20; v:v:v) seguido de 800 µl de tolueno/acetato-etilo (60/40; v:v). A amostra foi então aplicada numa coluna de sílica (Bond Elut LRC, Varian, Turin, Italy), pré-ativada com 5 ml tolueno/acetato-etilo/metanol (60/40/30; v:v:v) e 5 ml de tolueno/acetato-etilo (60/40; v:v). Seguiu-se uma lavagem da coluna com 5 ml de tolueno/acetato-etilo (60/40; v:v), eluição

da amostra com 5 ml de tolueno/acetato-etilo/metanol (60/40/20; v:v:v), e secagem com uma corrente de N₂.

1.3.5.2. Doseamento

A concentração de LXs (LXA₄ e 15-epi-LXA₄) foi quantificada no plasma e na urina por ensaios imunoenzimáticos, utilizando *kits* ELISA disponíveis comercialmente. As amostras e os padrões de LXs foram adicionadas a uma placa revestida com um anticorpo para a LXA₄ ou 15-epi-LXA₄. Seguidamente, adicionou-se um conjugado enzimático que compete com as LXs da amostra para um número limitado de sítios de ligação no anticorpo. Após um período de incubação e lavagem da placa, adicionou-se o substrato enzimático que promove o desenvolvimento de cor, permitindo detetar a quantidade de conjugado enzimático ligado ao anticorpo da placa. A absorvância foi lida a 650 nm. O desenvolvimento de cor é inversamente proporcional à quantidade de LXs presente nas amostras e padrões.

1.4. Marcadores de stresse oxidativo

1.4.1. Ácido úrico

O AU sérico foi quantificado num multianalisador bioquímico no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de S. João.

1.4.2. Capacidade antioxidante total

A TAS foi avaliada no plasma por um ensaio espectrofotométrico em leitor de placas, utilizando um *kit* comercial (Antioxidant Assay kit, *Cayman Chemical*). Este ensaio avalia a atividade antioxidante combinada de todos os compostos hidrossolúveis e lipossolúveis presentes no plasma, incluindo vitaminas, UA, bilirrubina, albumina e glutathiona.

1.4.3. H₂O₂ e Isop

O H₂O₂ foi quantificado na urina de 24h, por um ensaio fluorimétrico, utilizando um *kit* comercial (Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay kit, *Molecular Probes*) e um fluorímetro de placas. Os Isop foram também quantificados na urina de 24h por um ensaio imunoenzimático, utilizando um *kit* comercial (Enzyme Immunoassay for Urinary

Isoprostanes, *Oxford Biomedical Research*) e um leitor de placas. A creatinina urinária foi quantificada num multianalisador automático no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de S. João. A excreção urinária de H_2O_2 e de Isop foi expressa em função da concentração de creatinina na urina.

2. Resumo dos métodos analíticos

A Tabela 5 apresenta um resumo dos métodos analíticos utilizados para avaliar os marcadores inflamatórios e de stresse oxidativo (com exceção da PRC e do AU).

Tabela 5 - Lista dos testes para os biomarcadores do estudo.

Biomarcador	Fabricante (código)	Tipo de amostra	Método analítico
MPO concentração	BioCheck, Oxis Research (BC-1129)	Plasma	ELISA
MPO atividade	n.a.*	Plasma	Espectrofotometria
TAS	Cayman Chemical (709001)	Plasma	Espectrofotometria
H_2O_2	Molecular Probes (A22188)	Urina	Fluorimetria
Isop	Oxford Biomedical Research (EA85)	Urina	ELISA
LXA₄	Neogen Corporation (407010)	Urina e Plasma	ELISA
15-epi-LXA₄	Neogen Corporation (407110)	Urina e Plasma	ELISA

*n.a. não aplicável

3. Análise de resultados e estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (*standard error of the mean*, S.E.M.) e/ou representados graficamente por diagramas de extremos e quartis (“*Box-and-Whiskers plot*”) em que as linhas horizontais da caixa indicam, de baixo para cima, o primeiro quartil (Q1: contém 25% dos valores do grupo), o segundo quartil (Q2: contém 50% dos valores do grupo; coincide com a mediana) e o quartil superior (Q3:

contém 75% dos elementos do grupo). As linhas horizontais exteriores (*Whiskers*) à caixa representam os valores extremos (menor e maior) do grupo que não são *outliers* e os pontos isolados correspondem a *outliers*. A clearance estimada da creatinina foi calculada utilizando um programa da National Kidney Foundation (Cockcroft-Gault Calculator) que determina a clearance da creatinina com base na concentração plasmática da creatinina, peso corporal, género e idade do doente.

As diferenças entre dois grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student para amostras não emparelhadas ou pelo teste de Mann Whitney U, de acordo com a distribuição normal ou não normal da amostra, respetivamente. Foi também efetuado o teste ANOVA para comparações múltiplas para analisar diferenças entre quatro grupos. As correlações entre variáveis foram testadas pela correlação de Pearson, no caso de as variáveis apresentarem uma distribuição normal, ou pela correlação de Spearman, se pelo menos uma das variáveis apresentasse uma distribuição não normal. Foram considerados significativos os valores de *p* inferiores a 0,05.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

V - RESULTADOS

A - Dados demográficos dos doentes

Foram constituídos dois grupos de doentes (ICC moderada vs ICC grave) para a análise dos resultados. Considerou-se ICC moderada os doentes correspondentes a classes funcionais NYHA I, I/II ou II, e ICC grave doentes em NYHA II/III, III e III/IV. Este estudo incluiu uma população de 34 doentes, com 14 mulheres e 20 homens (Tabela 6). O grupo de doentes com ICC moderada apresenta um maior número de doentes do género masculino (13 em 18), ao contrário do grupo de doentes com ICC grave, que apresenta mais doentes do género feminino (9 em 16).

Relativamente à idade, não se observaram diferenças significativas entre o grupo de ICC moderada e o grupo de ICC grave. No entanto, observou-se uma redução significativa do peso corporal no grupo com ICC grave (Tabela 6).

Só 31% dos doentes com ICC grave é que estavam medicados com AAS, enquanto no grupo de ICC moderada o número de doentes tratados com este fármaco era consideravelmente superior (56%).

Tabela 6 - Distribuição dos doentes NYHA (Classe I/II e III/IV) por género, idade, peso e terapêutica com AAS.

		Masculino n=20	Feminino n=14	Total n=34
Género				
ICC	moderada	72% (13/18)	28% (5/18)	53% (18/34)
	Grave	44% (7/16)	56% (9/16)	47% (16/34)
Idade (anos)				
ICC	moderada	70,46 ± 2,63	75,20 ± 4,04	71,50 ± 2,13
	Grave	73,14 ± 2,73	78,67 ± 2,93	76,25 ± 2,09
Peso (Kg)				
ICC	moderada	79,36 ± 3,87	63,54 ± 6,80	77,50 ± 3,69
	Grave	71,54 ± 3,58	61,40 ± 4,06	65,84 ± 2,98*
AAS				
ICC	moderada			56% (10/18)
	grave			31% (5/16)

*p<0,05 vs ICC moderada.

B - Marcadores de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo

1. Biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca

As concentrações plasmáticas de BNP e troponina são apresentadas na Figura 10. Os doentes com ICC grave apresentaram concentrações plasmáticas de BNP significativamente mais elevadas do que os doentes com ICC moderada (1464 ± 442 pg/ml vs. 555 ± 162 pg/ml, respetivamente, $p < 0,05$), correspondendo a um aumento de aproximadamente de 3 vezes na classe de ICC grave. Não se observaram diferenças significativas nas concentrações de troponina entre os dois grupos.

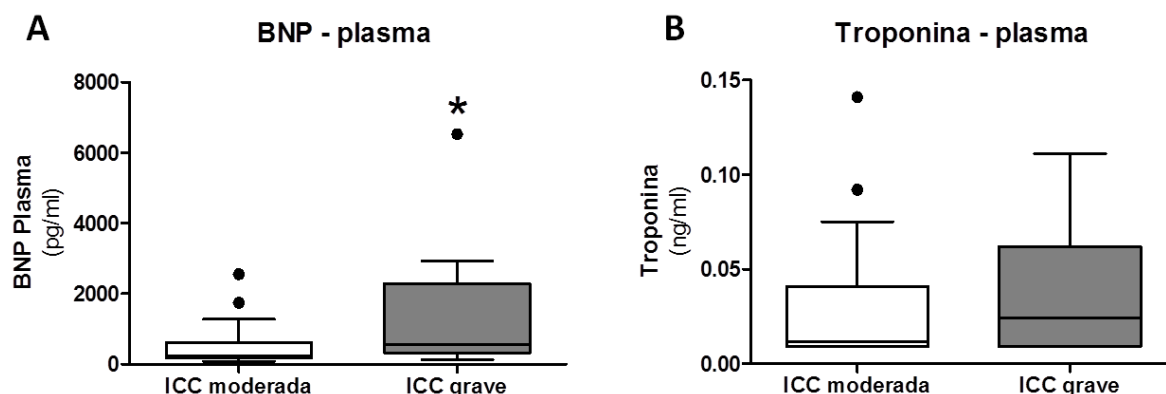


Figura 10 - Concentração plasmática do BNP (A) e troponina (B) em doentes com ICC moderada (n=18) e grave (n=15). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (*Box-and-Whiskers-Plot*). * $p < 0.05$ vs. doentes com ICC moderada.

2. Marcadores Inflamatórios

2.1. PRC

Não se verificaram diferenças significativas na concentração plasmática de PRC entre os doentes com ICC moderada e ICC grave (Figura 11).

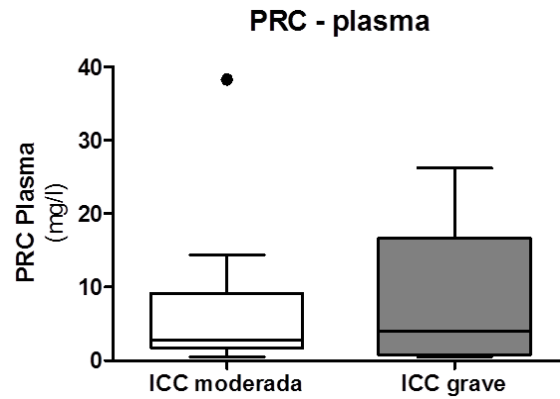


Figura 11 - Concentração plasmática da PRC em doentes com ICC moderada (n=18) e grave (n=16). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (*Box-and-Whiskers-Plot*).

2.2. Leucócitos totais, neutrófilos, monócitos e linfócitos

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na quantidade total de leucócitos do sangue periférico, nem no número de monócitos, neutrófilos, linfócitos, e rácio neutrófilos/linfócitos, entre os dois grupos de doentes (Figura 12).

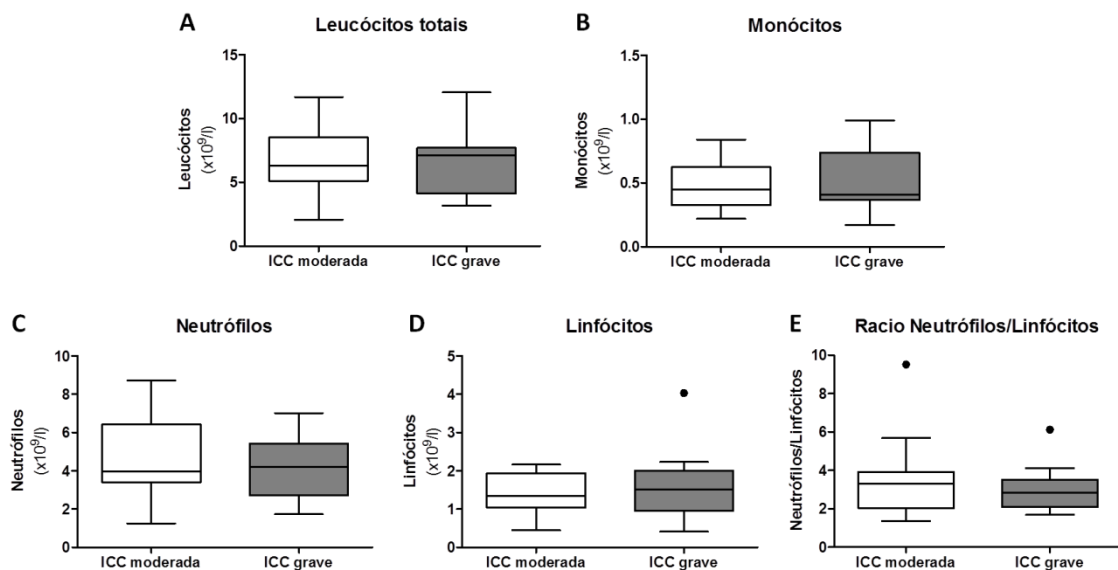


Figura 12 - Leucócitos totais (A), monócitos (B), neutrófilos (C), linfócitos (D), e rácio neutrófilos/linfócitos (E) em doentes com ICC moderada (n=18) e grave (n=16). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (*Box-and-Whiskers-Plot*).

2.3. MPO

Na Figura 13A está representada a concentração plasmática da MPO. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na concentração de MPO entre os grupos. No entanto, os doentes com ICC grave apresentaram um aumento significativo, de aproximadamente 3 vezes, da atividade da MPO, em comparação com os doentes

com ICC moderada ($45,15 \pm 11,56$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ MPO vs. $15,90 \pm 2,80$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ MPO, respetivamente) (Figura 13B).

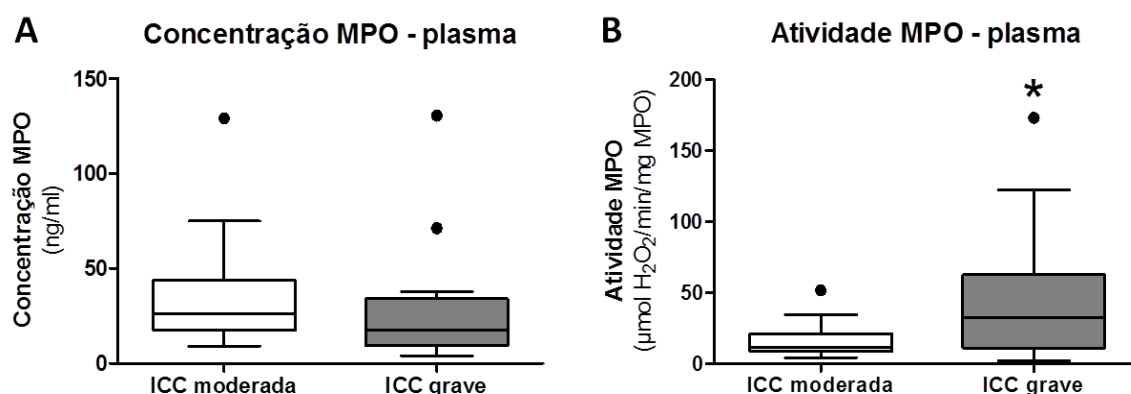


Figura 13 - Concentração (A) e atividade (B) MPO plasmática em doentes com ICC moderada (n=18) e grave (n=16). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (*Box-and-Whiskers-Plot*). * $p < 0.05$ vs. doentes com ICC moderada.

2.4. LXs

2.4.1. Concentração sistémica de LXA_4 e 15-epi- LXA_4

Na Figura 14 estão representadas as concentrações de LXA_4 e 15-epi- LXA_4 no plasma. Observou-se uma diminuição significativa da concentração de LXA_4 nos doentes com ICC grave ($0,262 \pm 0,034$ ng/ml vs. $0,362 \pm 0,039$ ng/ml, $p < 0,05$ vs. doentes com ICC moderada). Não se verificaram diferenças na concentração plasmática de 15-epi- LXA_4 entre os dois grupos.

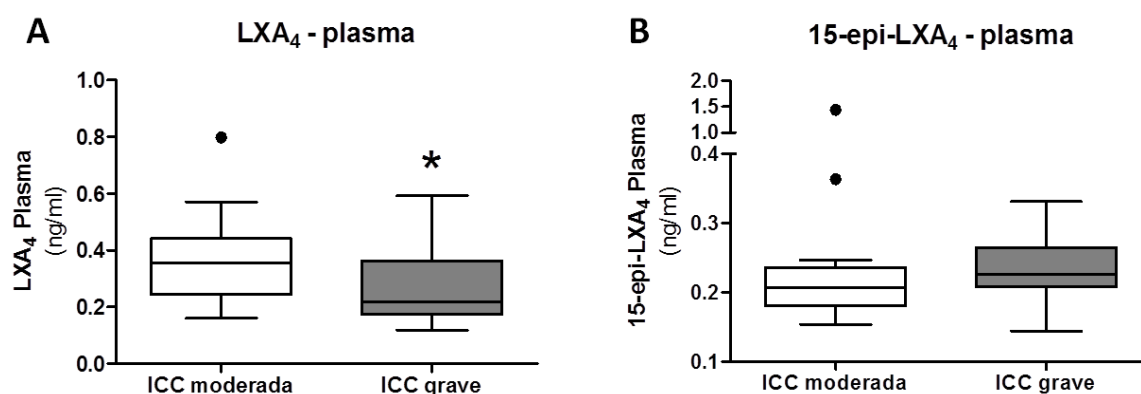


Figura 14 - Concentração plasmática de LXA_4 (A) e de 15-epi- LXA_4 (B) em doentes com ICC moderada (n=17) e grave (n=15). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (*Box-and-Whiskers-Plot*). * $p < 0,05$ vs. doentes ICC moderada.

2.4.2. Excreção urinária de LXA₄

Para estudar a excreção urinária de LXA₄, realizaram-se três tipos de normalizações dos resultados: em função do volume de urina excretado por dia (Figura 15A), em função da clearance estimada de creatinina (Figura 15B) e em função da concentração urinária de creatinina (Figura 15C). Não foram observadas variações significativas na excreção urinária de LXA₄ entre os dois grupos de doentes, para qualquer das análises efetuadas.

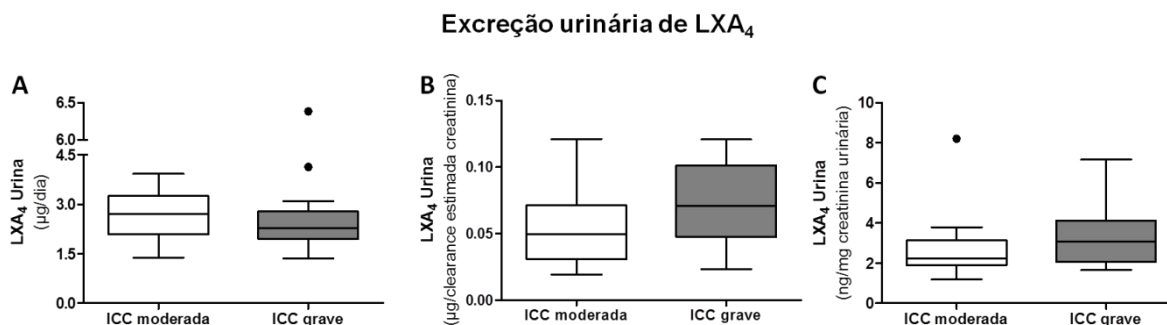


Figura 15 - Excreção urinária de LXA₄ por dia (A), por clearance estimada de creatinina (B) e por creatinina urinária (C) em doentes com ICC moderada (n=16-17) e grave (n=15-16). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (Box-and-Whiskers-Plot).

2.4.3. Excreção urinária de 15-epi-LXA₄

Para a análise da excreção urinária da 15-epi-LXA₄ também se realizaram três normalizações, tal como para a LXA₄ urinária. Apesar de a excreção urinária de 15-epi-LXA₄ ser tendencialmente menor no grupo de doentes com ICC grave, só se observou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos resultados normalizados em função do volume de urina excretado ($4,88 \pm 1,03$ µg/dia vs $2,28 \pm 0,44$ µg/dia, * $p < 0,05$ vs ICC moderada), não havendo variações na excreção normalizada em função da clearance da creatinina ou da creatinina urinária (Figura 16).

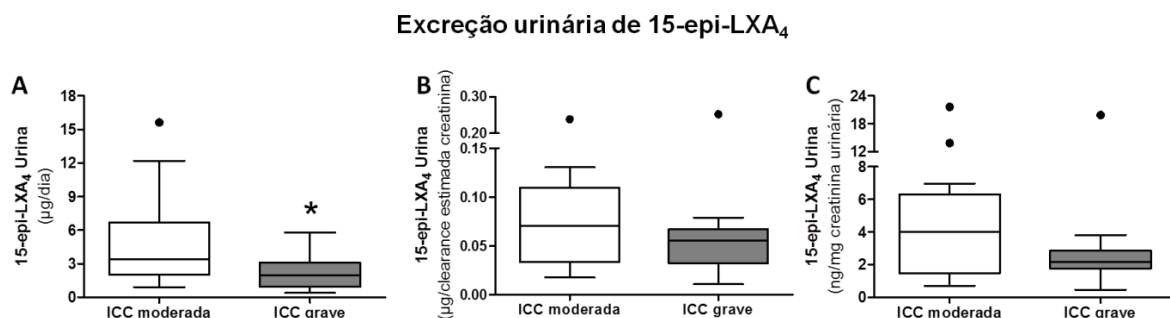


Figura 16 - Excreção urinária de 15-epi-LXA₄ por dia (A), por clearance estimada de creatinina (B) e por creatinina urinária (C) em doentes com ICC moderada (n=16-17) e grave (n=15-16). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (Box-and-Whiskers-Plot). * $p < 0,05$ vs. doentes ICC moderada.

3. Marcadores de stresse oxidativo

3.1. AU e TAS

Não se observaram diferenças significativas na concentração sérica de AU entre os dois grupos de doentes em estudo (Figura 17A) apesar de esta se encontrar tendencialmente aumentada nos doentes com ICC grave.

Relativamente à TAS, verificaram-se diferenças significativas entre os doentes com ICC moderada e ICC grave ($p < 0,0001$) (Figura 17B), com valores de $2,83 \pm 0,14$ $\mu\text{mol Trolox/ml}$ e $3,90 \pm 0,12$ $\mu\text{mol Trolox/ml}$, respetivamente.

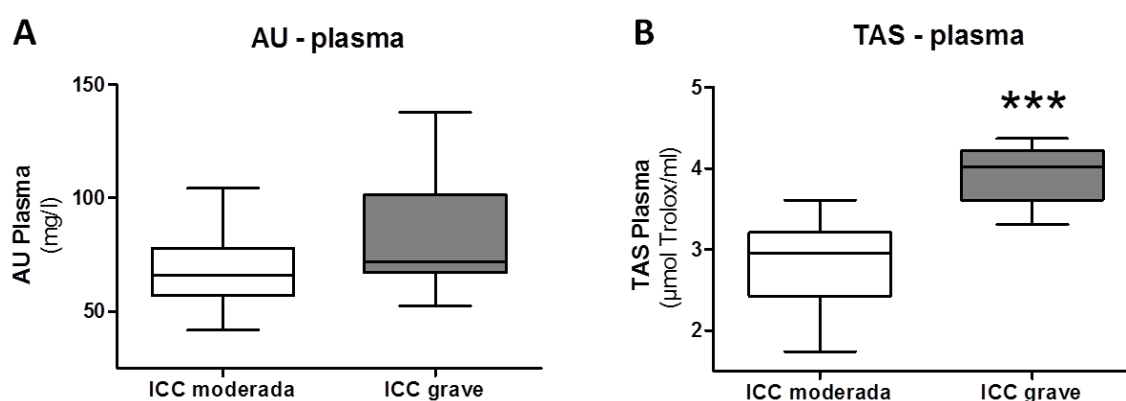


Figura 17 - Concentração sérica de AU (A) e TAS no plasma (B) de doentes com ICC moderada (n=14-17) e grave (n=9-15). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (Box-and-Whiskers-Plot). *** $p < 0,001$ vs. doentes com ICC moderada.

3.2. Excreção urinária de H_2O_2 e Isop

Não se observaram diferenças significativas na excreção urinária de H_2O_2 nem de Isop entre os doentes com ICC moderada e grave (Figura 18).

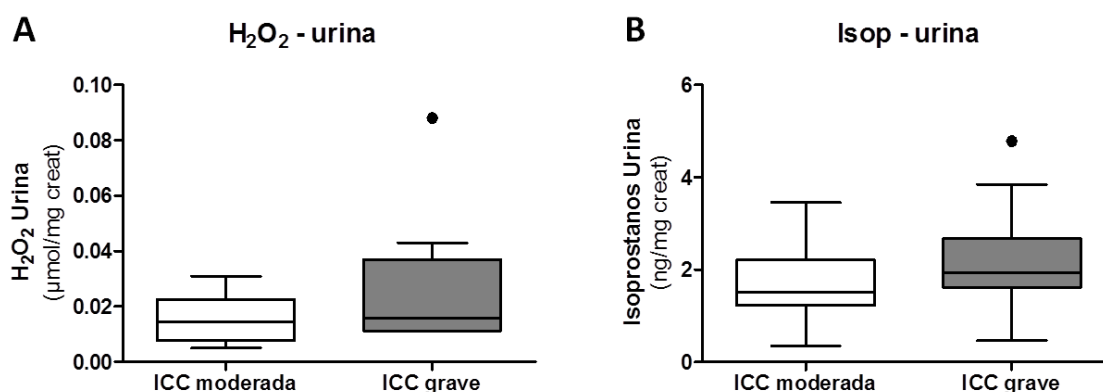


Figura 18 - Excreção urinária de H_2O_2 (A) e de Isop (B) em doentes com ICC moderada (n=14-16) e grave (n=8-14). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (Box-and-Whiskers-Plot).

C - Estudo da correlação entre as lipoxinas e biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca, de inflamação e de stresse oxidativo

Na Tabela 7 está resumida a análise das correlações entre a LXA₄ plasmática e os vários parâmetros de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo. Observaram-se correlações inversas significativas ($p < 0,05$) entre a concentração plasmática de LXA₄ e a concentração sistémica de BNP, troponina, PRC e AU. Não se observaram correlações entre a concentração plasmática de LXA₄ e a sua excreção urinária, nem entre a LXA₄ plasmática e os restantes biomarcadores.

Tabela 7 - Correlações entre a LXA₄ plasmática e os biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo (n= 22-34).

Correlações entre a LXA ₄ Plasmática e outros biomarcadores				
Biomarcador		Coefficiente correlação de Spearman (r)	p	
Disfunção/lesão cardíaca	BNP	-0,397	0,024	
	Troponina	-0,422	0,018	
Inflamação/redox	PRC	-0,404	0,022	
	Rácio N/L	0,043	n.s.	
	Concentração MPO	0,185	n.s.	
	Atividade MPO	-0,301	0,09	
Stresse oxidativo	AU	-0,379	0,039	
	TAS	-0,264	n.s.	
	H ₂ O ₂	-0,379	n.s.	
	Isop	0,014	n.s.	
Lipoxinas	Excreção urinária	LXA ₄ µg/dia	0,244	n.s.
		LXA ₄ µg/clearance estimada creatinina	-0,089	n.s.
		LXA ₄ µg/mg creatinina urinária	-0,095	n.s.
	Plasma	15-epi-LXA ₄	0,215	n.s.
	Excreção urinária	15-epi-LXA ₄ µg/dia	-0,085	n.s.
		15-epi-LXA ₄ µg/clearance estimada creatinina	-0,148	n.s.
		15-epi-LXA ₄ µg/mg creatinina urinária	-0,158	n.s.

n.s não significativo

Na Tabela 8 estão resumidas as correlações entre a 15-epi-LXA₄ plasmática e os biomarcadores estudados. Não se observaram correlações significativas entre a 15-epi-LXA₄ plasmática e os restantes biomarcadores, com exceção de uma correlação positiva entre a 15-epi-LXA₄ e o BNP ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Correlações entre a 15-epi-LXA₄ plasmática e os biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo (n= 22-34).

Correlações entre a 15-epi-LXA ₄ plasmática e outros biomarcadores				
Biomarcador		Coeficiente correlação de Spearman (r)	p	
Disfunção/lesão cardíaca	BNP	0,442	0,011	
	Troponina	-0,120	n.s.	
Inflamação/redox	PRC	-0,113	n.s.	
	Rácio N/L	0,141	n.s.	
	Concentração MPO	0,073	n.s.	
	Atividade MPO	-0,048	n.s.	
Stresse oxidativo	AU	-0,100	n.s.	
	TAS	0,320	n.s.	
	H ₂ O ₂	0,042	n.s.	
	Isop	-0,030	n.s.	
Lipoxinas	Excreção urinária	15-epi-LXA ₄ µg/dia	-0,360	n.s.
		15-epi-LXA ₄ µg/clearance estimada creatinina	-0,206	n.s.
		15-epi-LXA ₄ µg/mg creatinina urinária	-0,190	n.s.
	Plasma	LXA ₄	0,215	n.s.
	Excreção urinária	LXA ₄ µg/dia	-0,199	n.s.
		LXA ₄ µg/clearance estimada creatinina	0,034	n.s.
LXA ₄ µg/mg creatinina urinária		0,054	n.s.	

n.s não significativo

D - Influência da terapêutica com AAS na concentração de LXs e outros biomarcadores

1. Efeito do tratamento com AAS na concentração sistêmica de LXA₄ e 15-epi-LXA₄

O tratamento com AAS não teve efeitos significativos na concentração sistêmica de LXs nos doentes com ICC moderada, nem nos doentes com ICC grave (Figura 19).

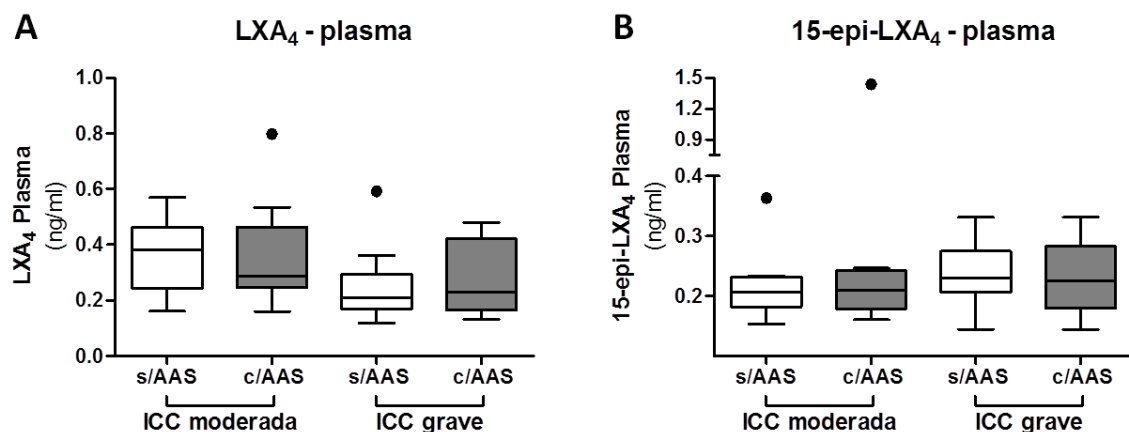


Figura 19 - Efeito do tratamento com AAS na concentração plasmática de LXA₄ (A) e 15-epi-LXA₄ (B) em doentes com ICC moderada (n=8 s/AAS vs. 9 c/AAS) e doentes com ICC grave (n=10 s/AAS vs. 5 c/AAS). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (*Box-and-Whiskers-Plot*).

2. Efeito do tratamento com AAS na excreção urinária de LXA₄

Não se observaram efeitos significativos do tratamento com AAS na excreção urinária de LXA₄ nos grupos de doentes estudados (Figura 20).

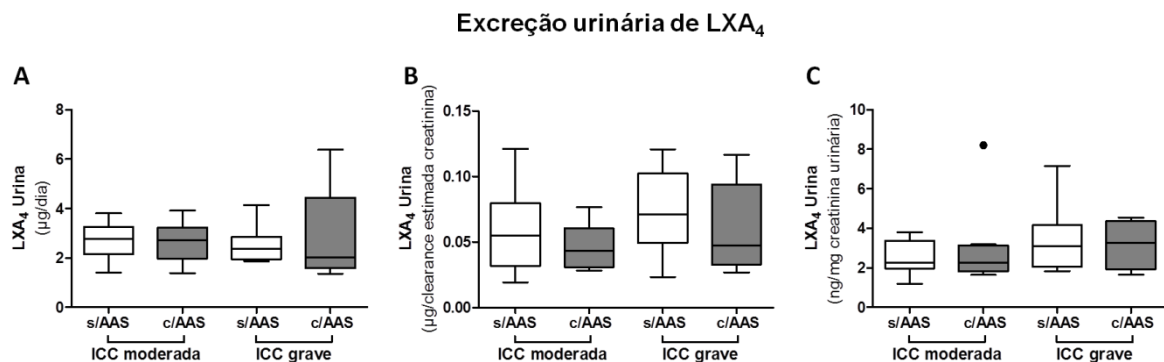


Figura 20 - Efeito do tratamento com AAS na excreção urinária de LXA₄ em doentes com ICC moderada (n=8 s/AAS vs. 8 c/AAS) e ICC grave (n=10 s/AAS vs. 5 c/AAS): excreção por dia (A), excreção por clearance estimada de creatinina (B), e excreção por creatinina urinária (C). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (*Box-and-Whiskers-Plot*).

3. Efeito do tratamento com AAS na excreção urinária de 15-epi-LXA₄

Relativamente à excreção urinária de 15-epi-LXA₄ verificou-se um aumento substancial da sua excreção nos doentes com ICC moderada tratados com AAS, independentemente do tipo de normalização dos resultados. Este efeito do tratamento com AAS não se observou nos doentes com ICC grave, sendo a excreção urinária de 15-epi-LXA₄ significativamente menor do que a encontrada nos doentes com ICC moderada tratados com AAS (Figura 21).

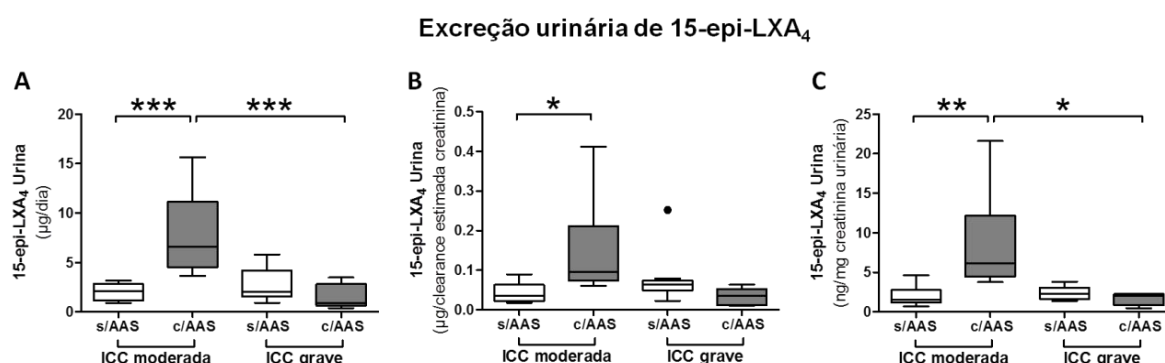


Figura 21 - Efeito do tratamento com AAS na excreção urinária de 15-epi-LXA₄ em doentes com ICC moderada (n=8 s/AAS vs. 8 c/AAS) e ICC grave (n=9 s/AAS vs. 5 c/AAS): excreção por dia (A), excreção por clearance estimada de creatinina (B) e excreção por creatinina urinária (C). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (*Box-and-Whiskers-Plot*). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4. Efeito do tratamento com AAS nos restantes marcadores inflamatórios e de stresse oxidativo

Não se observaram efeitos significativos do tratamento com AAS nos restantes marcadores inflamatórios e de stresse oxidativo nos doentes com ICC moderada e grave (resultados não apresentados).

5. Efeito do tratamento com AAS nos marcadores de disfunção/lesão cardíaca

Não se verificaram diferenças significativas na concentração de BNP e troponina nos grupos tratados com AAS. No entanto, a concentração de BNP era tendencialmente mais baixa nos doentes com ICC moderada tratados com AAS (Figura 22).

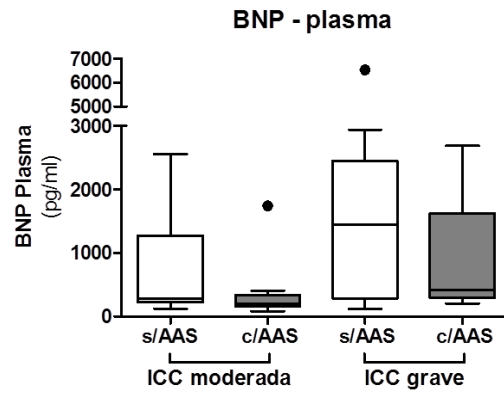


Figura 22 - Efeito do tratamento com AAS na concentração plasmática do BNP em doentes com ICC moderada (n=8 s/AAS vs. 10 c/AAS) e ICC grave (n=10 s/AAS vs. 5 c/AAS). Resultados apresentados em diagramas de extremos e quartis (*Box-and-Whiskers-Plot*).

CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO

VI - DISCUSSÃO

A formação de AA, resultante da hidrólise de fosfolípidos da membrana celular, e a sua posterior oxigenação por cicloxigenases e/ou lipoxigenases são passos críticos na regulação de processos inflamatórios nos quais se inicia a biossíntese de potentes compostos bioativos designados de eicosanoides, nos quais estão incluídas as LXs (Samuelsson, Funk et al. 1989). O recente e crescente interesse nas LXs foi motivado pela descoberta de que a regressão da inflamação é um processo ativo que envolve mediadores anti-inflamatórios produzidos por lipoxigenases no decurso de interações celulares (Chan and Moore 2010). Foi já demonstrada uma diminuição da produção destes compostos em algumas doenças crónicas tais como asma (Bonnans, Vachier et al. 2002), doença hepática (Claria, Titos et al. 1998) e leucemia mieloide (Stenke, Nasman-Glaser et al. 1991). Contudo, apesar de ser amplamente reconhecido o papel da inflamação na patogénese da ICC, não existem ainda estudos sobre as LXs nesta patologia. O nosso trabalho pretendeu assim investigar a relação entre estes mediadores anti-inflamatórios e a progressão da ICC, bem como analisar o efeito do tratamento com AAS na produção destas moléculas. Uma das principais conclusões do nosso estudo é que o agravamento da ICC está associado a uma diminuição da LXA₄ sistémica. Isto é corroborado não só pela observação de menores concentrações deste eicosanoide no plasma de doentes com ICC grave mas também pela demonstração da existência de correlações inversas significativas entre a LXA₄ plasmática e diversos marcadores estabelecidos de IC, tais como o BNP, a troponina, a PRC e o AU. Estes resultados sugerem ainda que a LXA₄ plasmática pode ser também usada como um biomarcador na IC.

A redução da concentração sistémica de LXA₄ não parece ser devida a maior eliminação renal deste composto uma vez que não se verificou o aumento da sua excreção urinária nos doentes mais graves, nem a existência de uma correlação inversa entre a LXA₄ plasmática e urinária. Foi já descrito que a diminuição da concentração de LXs observada em algumas doenças inflamatórias envolve a desregulação de enzimas envolvidas na sua produção, tais como a 15-LO (Levy 2005) com consequente decréscimo da capacidade de biossíntese destas moléculas. Contudo, não podemos excluir que a diminuição da LXA₄ plasmática seja causada por uma maior inativação metabólica catalisada pela 15-PGDH. É importante sublinhar que o aumento da expressão e/ou atividade desta enzima poderia contribuir não só para o aumento do

catabolismo da LXA₄ mas também para a inibição indireta da sua produção. De facto, é sabido que a 15-PGDH é responsável pela inativação de vários eicosanóides, entre os quais a PGE₂ que parece ter um papel importante na indução da biossíntese da LXA₄ (Ivanov and Romanovsky 2004; Chan and Moore 2010).

Tem sido sugerido que a desregulação da síntese de LXs está relacionada com a dificuldade de resolução de uma reação inflamatória aguda, contribuindo para a progressão para um estado de inflamação crónica (McMahon and Godson 2004). Nos doentes com ICC grave foi evidenciado um aumento da atividade da MPO, uma enzima libertada pelos leucócitos ativados e conhecida pelas suas propriedades pró-inflamatórias e pró-oxidantes que contribuem para a disfunção endotelial, aterogénese, remodelação estrutural do miocárdio e arritmias cardíacas. Uma vez que as LXs inibem o recrutamento de leucócitos, a quimiotaxia e a adesão de neutrófilos ao endotélio e reduzem a atividade da MPO, não é de estranhar que a redução de LXs esteja associada a uma maior atividade desta enzima na ICC grave. Contudo, não foram observadas diferenças na concentração plasmática desta enzima, nem na contagem de leucócitos do sangue periférico. A concentração de MPO tem sido utilizada como marcador de inflamação (Kehl, Iqbal et al. 2012). Vários estudos descreveram que a concentração desta enzima aumenta com a gravidade da ICC (Tang, Brennan et al. 2006; Eleuteri, Di Stefano et al. 2009) o que poderá refletir uma exacerbação da ativação leucocitária, inflamação e stresse oxidativo (Tang, Brennan et al. 2006). A quantidade de leucócitos totais, bem como os seus subtipos e a razão N/L são também frequentemente utilizados para avaliar a ativação leucocitária e inflamação sistémica. O seu aumento está associado a eventos clínicos adversos e deste modo, a um maior risco de mortalidade (Tamhane, Aneja et al. 2008; Uthamalingam, Patvardhan et al. 2011; Imtiaz, Shafique et al. 2012). Contrariamente ao previsto, os nossos resultados não sugerem um aumento da ativação leucocitária. No entanto, também é possível que estes marcadores não sejam suficientemente sensíveis para detetar alterações significativas em populações pequenas como a do nosso estudo. De facto, é usual recorrer a uma estratégia de multi-marcadores para avaliar a ativação leucocitária (Santos-Silva, Rebelo et al. 2001).

A concentração de uma enzima pode não estar diretamente relacionada com a sua atividade e inclusivamente foi já descrito que a atividade da MPO é independente da quantidade de neutrófilos (Kitahashi, Hino et al. 2000). Assim, quando se estuda o papel fisiopatológico de uma enzima é mais correto avaliar quer a quantidade quer a atividade enzimática. Tanto quanto sabemos, não existem ainda estudos publicados sobre a atividade de MPO na ICC humana. O nosso trabalho sugere que a atividade de MPO é um biomarcador inflamatório mais sensível do que a concentração desta enzima e poderá

funcionar como uma ferramenta adicional para o diagnóstico, prognóstico e monitorização da terapêutica da ICC.

A elevação significativa da TAS no plasma foi outra alteração importante observada nos doentes com ICC grave. Alguns estudos referem que o AU contribui para mais de 50% desta capacidade antioxidante plasmática e que o aumento da TAS reflete sobretudo a elevação da concentração do AU que é um reconhecido biomarcador de risco cardiovascular (Young and Woodside 2001; Chuang, Shiesh et al. 2006). O aumento da concentração de AU está associado a um agravamento do prognóstico cardiovascular (Alderman, Cohen et al. 1999; Anker, Doehner et al. 2003). Estudos anteriores demonstraram que a concentração de AU na IC é tanto maior quanto mais grave o estado da doença (Leyva, Anker et al. 1997; Leyva, Anker et al. 1998; Leyva, Chua et al. 1998; Tereshchenko, Levchuk et al. 2000). No entanto, apesar de a concentração de AU estar tendencialmente aumentada nos doentes mais graves, neste estudo não se verificaram alterações significativas entre os dois grupos. Este facto pode indicar também uma maior sensibilidade da TAS como biomarcador de risco cardiovascular, comparativamente com o AU. Foi já sugerida a utilidade clínica da TAS como marcador da gravidade de condições patológicas como a sépsis (Chuang, Shiesh et al. 2006).

A ICC grave está ainda associada a uma redução significativa da excreção urinária de 15-epi-LXA₄, mas não da sua concentração plasmática. Esta diminuição não parece dever-se a uma maior inativação mediada pela 15-PGDH, uma vez que não foram detetadas alterações na excreção urinária de LXA₄ que, como se sabe, é mais suscetível à degradação enzimática do que a 15-epi-LXA₄ (Serhan, Maddox et al. 1995; Maddox 1997; Clish 1999). Assim, a diminuição da excreção urinária destes compostos poderá ser causada por uma redução da capacidade biossintética destes compostos no rim. A alteração da atividade e/ou expressão de enzimas como a COX-2, o citocromo P450 e a 5-LO pode comprometer a produção destas LXs, justificando os resultados obtidos (Levy 2006). No entanto, o facto de as normalizações para a clearance estimada da creatinina ou para a creatinina urinária anularem a significância estatística neste parâmetro sugere que a insuficiência renal possa ser o principal responsável pela diferença observada na excreção de 15-epi-LXA₄ nos doentes com ICC grave.

A IC está associada a um estado hipercoagulante, formação de trombos e embolismo cerebral (Kalaria, Passannante et al. 1998; Lip and Gibbs 1999; Uretsky, Thygesen et al. 2000). Sabe-se ainda que as plaquetas desempenham um papel fundamental na trombose coronária, o que as torna um alvo terapêutico. Por este motivo, torna-se clara a razão para a utilização de antiagregantes plaquetários como o AAS no tratamento da ICC. Tem sido descrito que o efeito protetor cardiovascular do AAS se

deve fundamentalmente às suas propriedades antiagregantes plaquetárias e não à sua atividade anti-inflamatória mediada pela inibição da COX-2, existindo ainda muita controvérsia em relação a este assunto, (Feng, Tracy et al. 2000; Azar, Klayme et al. 2003). No entanto, além de inibir irreversivelmente a COX-1 e reduzir consequentemente a síntese de tromboxanos, o AAS altera o perfil de atividade da COX-2 que passa a produzir 15-epi-LXA₄ em vez de PGs (Stables and Gilroy 2011). O AAS pode ainda exercer efeitos antioxidantes diretos ou inibir indiretamente a produção de ROS (Chen, Zhao et al. 2012). Foi já descrito que doentes medicados com AAS mostraram reduções significativas no risco de morte cardiovascular (Hennekens, Dyken et al. 1997). Doses baixas deste fármaco (65 - 325mg/dia) parecem ser benéficas na redução de ataques cardíacos (Hennekens, Buring et al. 1989). Apesar dos mecanismos supracitados, neste estudo não foram encontradas diferenças na LXA₄ plasmática e urinária, nem na 15-epi-LXA₄ plasmática, induzidas pela terapêutica com AAS. No entanto, o tratamento com AAS aumentou marcadamente a excreção urinária de 15-epi-LXA₄ nos doentes com ICC moderada, sugerindo uma maior síntese deste composto no rim (Claria and Serhan 1995). Vários estudos demonstram que a COX-2 é expressa de forma constitutiva no rim (Brater, Harris et al. 2001; Harris 2006). O grande aumento da excreção urinária de 15-epi-LXA₄, mas não da 15-epi-LXA₄ plasmática, nos doentes tratados com AAS, poderá indicar uma indução da COX-2 maioritariamente renal nas fases iniciais da ICC. Contudo, esta suposta capacidade biossintética de 15-epi-LXA₄ perde-se nos doentes graves provavelmente devido ao maior estado de inflamação e oxidação e lesão renal.

Embora não tenhamos observado alterações estatisticamente significativas nos restantes biomarcadores de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo nos doentes tratados com AAS, verificámos que a concentração de BNP estava tendencialmente diminuída nos doentes com ICC moderada tratados com AAS. Isto sugere que o aumento da produção renal de 15-epi-LXA₄ tem um efeito protetor na função cardíaca.

Os peptídeos natriuréticos têm vindo a ganhar importância enquanto biomarcadores para o diagnóstico de IC e disfunção do miocárdio (Kehl, Iqbal et al. 2012). O BNP é um dos mais completos fatores preditivos de mortalidade e hospitalização relacionada com IC, e tem ações preponderantes contra anomalias fisiológicas no coração (Kehl, Iqbal et al. 2012). Os nossos resultados são concordantes com estudos anteriores (Sugiura, Takase et al. 2005; Vickery, Price et al. 2005) nos quais a concentração de BNP apresenta elevada precisão no diagnóstico e estratificação do risco de ICC, observando-se valores superiores a 400 pg/ml que são indicadores de um diagnóstico provável de ICC (Januzzi, Camargo et al. 2005; Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008). A elevação significativa de BNP nos doentes com ICC grave, em comparação com

os doentes com ICC moderada, valida a avaliação clínica e estratificação da população consoante a gravidade da doença. Por outro lado, a ausência de alterações expressivas na concentração sistémica de troponina, PRC e AU e na excreção urinária de H_2O_2 ou de Isop poder-se-á dever quer ao ainda reduzido número de doentes envolvidos neste estudo, quer ao efeito de diversos fármacos usados na terapêutica da IC, como os bloqueadores β , inibidores da enzima de conversão da angiotensina ou antagonistas dos recetores da angiotensina II que poderão exercer efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Giordano 2005; Dandona, Ghanim et al. 2007; Evangelista, Garbin et al. 2007).

O estudo realizado apresenta assim algumas limitações, tais como o número reduzido de doentes e a distribuição desigual da população quanto ao género, classes funcionais e terapêutica. Efetivamente, a população apresentava um predomínio de doentes do género masculino e com IC moderada, além de o número de doentes com ICC grave tratados com AAS ser muito inferior ao do grupo de doentes graves não tratados com este fármaco.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÃO

VII - CONCLUSÃO

O agravamento da ICC está associado a uma redução significativa da LXA₄ sistémica e a uma exacerbação da atividade da MPO plasmática. Nos doentes com ICC grave observou-se também um aumento significativo da TAS causado muito provavelmente pela elevação da concentração de AU sérico. O facto de a LXA₄ apresentar correlação inversa com muitos dos marcadores estabelecidos de IC, tais como o BNP, troponina, PRC e AU, sugere não só a sua importância na fisiopatologia da ICC, mas também a sua provável utilidade como biomarcador nesta patologia.

O tratamento com AAS aumentou marcadamente a excreção urinária de 15-epi-LXA₄ nos doentes com IC moderada. Este efeito poderá ser causado por uma maior produção renal de 15-epi-LXA₄ e parece contribuir para a melhoria da função cardíaca evidenciada pela redução do BNP nestes doentes. No entanto, nos doentes graves não se verificam estes efeitos provavelmente devido a uma deterioração da função renal.

Os restantes parâmetros de disfunção/lesão cardíaca, inflamação e stresse oxidativo não estavam alterados na ICC grave, com exceção do BNP cuja concentração plasmática estava consideravelmente aumentada, e não foram modificados pelo tratamento com AAS. No entanto, o número reduzido de doentes e a distribuição desigual quanto ao género, classes funcionais e terapêutica podem ter influenciado os resultados deste estudo.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alderman, M. H., H. Cohen, et al. (1999). "Serum uric acid and cardiovascular events in successfully treated hypertensive patients." *Hypertension* **34**(1): 144-150.
- Alonso-Martínez, J. L., B. Llorente-Diez, et al. (2002). "C-reactive protein as a predictor of improvement and readmission in heart failure." *European Journal of Heart Failure* **4**(3): 331-336.
- Andrews, P. C. and N. I. Krinsky (1982). "Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate." *Anal Biochem* **127**(2): 346-350.
- Anker, S. D., W. Doehner, et al. (2003). "Uric acid and survival in chronic heart failure: validation and application in metabolic, functional, and hemodynamic staging." *Circulation* **107**(15): 1991-1997.
- Araujo, J. P., P. Lourenco, et al. (2009). "Prognostic value of high-sensitivity C-reactive protein in heart failure: a systematic review." *J Card Fail* **15**(3): 256-266.
- Azar, R. R., S. Klayme, et al. (2003). "Effects of aspirin (325 mg/day) on serum high-sensitivity C-reactive protein, cytokines, and adhesion molecules in healthy volunteers." *Am J Cardiol* **92**(2): 236-239.
- Backes, J. M., P. A. Howard, et al. (2004). "Role of C-reactive protein in cardiovascular disease." *Ann Pharmacother* **38**(1): 110-118.
- Baldus, S., C. Heeschen, et al. (2003). "Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes." *Circulation* **108**(12): 1440-1445.
- Baldus, S., R. Koster, et al. (2005). "Oxypurinol improves coronary and peripheral endothelial function in patients with coronary artery disease." *Free Radic Biol Med* **39**(9): 1184-1190.
- Bannenberg, G. L. (2005). "Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins." *J. Immunol.* **174**: 4345-4355.
- Basu, S. (2004). "Review Isoprostanes: Novel Bioactive Products of Lipid Peroxidation." *Free Radical Research* **38**(2): 105-122.
- Basu, S. (2010). "Fatty acid oxidation and isoprostanes: Oxidative strain and oxidative stress." *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **82**(4-6): 219-225.
- Berry, C. E. and J. M. Hare (2004). "Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications." *J Physiol* **555**(Pt 3): 589-606.
- Bonnans, C., I. Vachier, et al. (2002). "Lipoxins Are Potential Endogenous Antiinflammatory Mediators in Asthma." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **165**(11): 1531-1535.
- Brater, D. C., C. Harris, et al. (2001). "Renal effects of COX-2-selective inhibitors." *Am J Nephrol* **21**(1): 1-15.
- Braunwald, E. (2008). "Biomarkers in heart failure." *N Engl J Med* **358**(20): 2148-2159.
- Brennan, M. L., M. S. Penn, et al. (2003). "Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain." *N Engl J Med* **349**(17): 1595-1604.
- Cai, H. (2005). "Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences." *Cardiovascular Research* **68**(1): 26-36.
- Chan, M. M. and A. R. Moore (2010). "Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production." *J Immunol* **184**(11): 6418-6426.
- Chen, B., J. Zhao, et al. (2012). "Aspirin inhibits the production of reactive oxygen species by downregulating Nox4 and inducible nitric oxide synthase in human endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein." *J Cardiovasc Pharmacol* **59**(5): 405-412.

- Chiang, N. (2006). "The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo." *Pharmacol. Rev.* **58**: 463-487.
- Chiang, N., M. Arita, et al. (2005). "Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**(3-4): 163-177.
- Chiang, N., E. A. Bermudez, et al. (2004). "Aspirin triggers anti-inflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**: 15178-15183.
- Choi, Y. H., T. Saric, et al. (2011). "Cardiac cell therapies: the next generation." *Cardiovasc Ther* **29**(1): 2-16.
- Chuang, C. C., S. C. Shiesh, et al. (2006). "Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis." *Crit Care* **10**(1): R36.
- Claria, J. and C. N. Serhan (1995). "Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9475-9479.
- Claria, J., E. Titos, et al. (1998). "Altered biosynthesis of leukotrienes and lipoxins and host defense disorders in patients with cirrhosis and ascites." *Gastroenterology* **115**(1): 147-156.
- Clish, C. B. (1999). "Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**: 8247-8252.
- Clish, C. B., B. D. Levy, et al. (2000). "Oxidoreductases in lipoxin A4 metabolic inactivation: a novel role for 15-onoprostaglandin 13-reductase/leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase in inflammation." *J Biol Chem* **275**(33): 25372-25380.
- Cooper, H. A., D. V. Exner, et al. (1999). "White blood cell count and mortality in patients with ischemic and nonischemic left ventricular systolic dysfunction (an analysis of the Studies Of Left Ventricular Dysfunction [SOLVD])." *Am J Cardiol* **84**(3): 252-257.
- Cracowski, J. L., F. Tremel, et al. (2000). "Increased formation of F(2)-isoprostanes in patients with severe heart failure." *Heart* **84**(4): 439-440.
- Dandona, P., H. Ghanim, et al. (2007). "Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease." *J Hypertens* **25**(4): 731-741.
- Das, U. N. (2011a). "Vagal nerve stimulation in prevention and management of coronary heart disease." *World J Cardiol* **3**(4): 105-110.
- Das, U. N. (2011b). "Lipoxin A4 may function as an endogenous anti-arrhythmic molecule." *Medical hypotheses* **76**(1): 14-16.
- Daubert, M. A. and A. Jeremias (2010). "The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings." *Vasc Health Risk Manag* **6**: 691-699.
- de Lemos, J. A., D. A. Morrow, et al. (2001). "The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes." *N Engl J Med* **345**(14): 1014-1021.
- Dhiman, M., J. G. Estrada-Franco, et al. (2009). "Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease." *Clin Vaccine Immunol* **16**(5): 660-666.
- Dickstein, K. (1999). "Heart Failure Society of America (HFSA) practice guidelines. HFSA guidelines for management of patients with heart failure caused by left ventricular systolic dysfunction--pharmacological approaches." *J Card Fail* **5**(4): 357-382.
- Dickstein, K., A. Cohen-Solal, et al. (2008). "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)." *Eur Heart J* **29**(19): 2388-2442.
- Duan, X. and F. Ling (2008). "Is uric acid itself a player or a bystander in the pathophysiology of chronic heart failure?" *Medical hypotheses* **70**(3): 578-581.
- Duffy, B. K., H. S. Gurm, et al. (2006). "Usefulness of an elevated neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality after percutaneous coronary intervention." *Am J Cardiol* **97**(7): 993-996.

- Dufton, N., R. Hannon, et al. (2010). "Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation." *J Immunol* **184**(5): 2611-2619.
- Eleuteri, E., A. Di Stefano, et al. (2009). "Increased nitrotyrosine plasma levels in relation to systemic markers of inflammation and myeloperoxidase in chronic heart failure." *International Journal of Cardiology* **135**(3): 386-390.
- Elster, S. K., E. Braunwald, et al. (1956). "A study of C-reactive protein in the serum of patients with congestive heart failure." *Am Heart J* **51**(4): 533-541.
- Engstrom, G., O. Melander, et al. (2009). "Carotid intima-media thickness, systemic inflammation, and incidence of heart failure hospitalizations." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(10): 1691-1695.
- Evangelista, S., U. Garbin, et al. (2007). "Effect of DL-nebivolol, its enantiomers and metabolites on the intracellular production of superoxide and nitric oxide in human endothelial cells." *Pharmacol Res* **55**(4): 303-309.
- Feng, D., R. P. Tracy, et al. (2000). "Effect of short-term aspirin use on C-reactive protein." *J Thromb Thrombolysis* **9**(1): 37-41.
- Finkel, T. (1999). "Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells." *J Leukoc Biol* **65**(3): 337-340.
- Finkel, T. (2011). "Signal transduction by reactive oxygen species." *J Cell Biol* **194**(1): 7-15.
- Fiore, S., J. F. Maddox, et al. (1994). "Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor." *J Exp Med* **180**(1): 253-260.
- Fonarow, G. C. and T. B. Horwich (2003). "Combining natriuretic peptides and necrosis markers in determining prognosis in heart failure." *Rev Cardiovasc Med* **4 Suppl 4**: S20-28.
- Gajarsa, J. J. and R. A. Kloner (2011). "Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities." *Heart Fail Rev* **16**(1): 13-21.
- Ghiselli, A., M. Serafini, et al. (2000). "Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data." *Free Radical Biology and Medicine* **29**(11): 1106-1114.
- Giordano, F. J. (2005). "Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure." *J Clin Invest* **115**(3): 500-508.
- Godson, C., S. Mitchell, et al. (2000). "Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages." *J Immunol* **164**(4): 1663-1667.
- Goetze, J. P., C. Christoffersen, et al. (2003). "Increased cardiac BNP expression associated with myocardial ischemia." *FASEB J* **17**(9): 1105-1107.
- Grieve, D. J. and A. M. Shah (2003). "Oxidative stress in heart failure. More than just damage." *Eur Heart J* **24**(24): 2161-2163.
- Hall, C. (2004). "Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP." *Eur J Heart Fail* **6**(3): 257-260.
- Harris, R. C. (2006). "COX-2 and the kidney." *J Cardiovasc Pharmacol* **47 Suppl 1**: S37-42.
- Harzand, A., L. Tamariz, et al. (2012). "Uric Acid, Heart Failure Survival, and the Impact of Xanthine Oxidase Inhibition." *Congestive Heart Failure* **18**(3): 179-182.
- Hennekens, C. H., J. E. Buring, et al. (1989). "Aspirin and other antiplatelet agents in the secondary and primary prevention of cardiovascular disease." *Circulation* **80**(4): 749-756.
- Hennekens, C. H., M. L. Dyken, et al. (1997). "Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association." *Circulation* **96**(8): 2751-2753.
- Heymans, S., E. Hirsch, et al. (2009). "Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology." *Eur J Heart Fail* **11**(2): 119-129.

- Holvoet, P. (1998). "Oxidative modification of low-density lipoproteins in atherothrombosis." *Acta Cardiol* **53**(5): 253-260.
- Horne, B. D., J. L. Anderson, et al. (2005). "Which White Blood Cell Subtypes Predict Increased Cardiovascular Risk?" *Journal of the American College of Cardiology* **45**(10): 1638-1643.
- Horwich, T. B., et al. (2003). "Cardiac troponin I is associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure." *Circulation* **108**(7): 6.
- Huehnergath, K. V., D. Mozaffarian, et al. (2005). "Usefulness of Relative Lymphocyte Count as an Independent Predictor of Death/Urgent Transplant in Heart Failure." *The American journal of cardiology* **95**(12): 1492-1495.
- Huwiler, A. and J. Pfeilschifter (2009). "Lipids as targets for novel anti-inflammatory therapies." *Pharmacology & Therapeutics* **124**(1): 96-112.
- Imtiaz, F., K. Shafique, et al. (2012). "Neutrophil lymphocyte ratio as a measure of systemic inflammation in prevalent chronic diseases in Asian population." *Int Arch Med* **5**(1): 2.
- Ivanov, A. I. and A. A. Romanovsky (2004). "Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism." *Front Biosci* **9**: 1977-1993.
- Januzzi, J. L., C. A. Camargo, et al. (2005). "The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study." *American Journal of Cardiology* **95**(8): 948-954.
- Jialal, I. and S. Devaraj (2003). "Role of C-reactive protein in the assessment of cardiovascular risk." *The American journal of cardiology* **91**(2): 200-202.
- Jin, C., C. Hu, et al. (2009). "Effects of renal perfusion pressure on renal medullary hydrogen peroxide and nitric oxide production." *Hypertension* **53**(6): 1048-1053.
- Kadiiska, M. B., B. C. Gladen, et al. (2005). "Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning?" *Free Radical Biol. Med.* **38**(6): 698-710.
- Kalaria, V. G., M. R. Passannante, et al. (1998). "Effect of mitral regurgitation on left ventricular thrombus formation in dilated cardiomyopathy." *Am Heart J* **135**(2 Pt 1): 215-220.
- Kameda, K., T. Matsunaga, et al. (2003). "Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling." *Eur Heart J* **24**(24): 2180-2185.
- Kardys, I., A. M. Knetsch, et al. (2006). "C-reactive protein and risk of heart failure. The Rotterdam Study." *Am Heart J* **152**(3): 514-520.
- Kazanegra, R., V. Cheng, et al. (2001). "A rapid test for B-type natriuretic peptide correlates with falling wedge pressures in patients treated for decompensated heart failure: a pilot study." *J Card Fail* **7**(1): 21-29.
- Kehl, D. W., N. Iqbal, et al. (2012). "Biomarkers in acute myocardial injury." *Transl Res* **159**(4): 252-264.
- Kitahashi, S., M. Hino, et al. (2000). "Nonspecific Response of Enzyme Immunoassay System to Myeloperoxidase Antigen Released From Blast Cells in Patients With Nonlymphocytic Leukemia." *Laboratory Hematology* **6**: 121-125.
- Klebanoff, S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." *J Leukoc Biol* **77**(5): 598-625.
- Kociol, R. D., P. S. Pang, et al. (2010). "Troponin Elevation in Heart Failure Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications." *Journal of the American College of Cardiology* **56**(14): 1071-1078.
- Kojima, S., T. Sakamoto, et al. (2005). "Prognostic usefulness of serum uric acid after acute myocardial infarction (the Japanese Acute Coronary Syndrome Study)." *Am J Cardiol* **96**(4): 489-495.
- Kragelund, C., B. Gronning, et al. (2005). "N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease." *N Engl J Med* **352**(7): 666-675.
- Kushner, I., D. Rzewnicki, et al. (2006). "What Does Minor Elevation of C-Reactive Protein Signify?" *The American journal of medicine* **119**(2): 166.e117-166.e128.
- Levin, E. R., D. G. Gardner, et al. (1998). "Natriuretic peptides." *N Engl J Med* **339**(5): 321-328.

- Levine, B., J. Kalman, et al. (1990). "Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure." N Engl J Med **323**(4): 236-241.
- Levy, B. D. (2005). "Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma." Am. J. Respir. Crit. Care Med. **172**: 824-830.
- Levy, B. D. (2006). "Myocardial 15-epi-lipoxin A4 generation provides a new mechanism for the immunomodulatory effects of statins and thiazolidinediones." Circulation **114**(9): 873-875.
- Levy, B. D., C. B. Clish, et al. (2001). "Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution." Nat Immunol **2**(7): 612-619.
- Levy, B. D., K. Gronert, et al. (1999). Leukotriene and Lipoxin Biosynthesis. Handbook of Methods in Signal Transduction: Lipid Second Messengers. L. S. and R. R. P. Boca Raton, FL, CRC Press: 83-111.
- Leyva, F., S. Anker, et al. (1997). "Serum uric acid as an index of impaired oxidative metabolism in chronic heart failure." European Heart Journal **18**(5): 858-865.
- Leyva, F., S. D. Anker, et al. (1998). "Uric acid in chronic heart failure: a marker of chronic inflammation." Eur Heart J **19**(12): 1814-1822.
- Leyva, F., T.-P. Chua, et al. (1998). "Uric acid in chronic heart failure: A measure of the anaerobic threshold." Metabolism **47**(9): 1156-1159.
- Libby, P. (2003). "Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art." Am J Cardiol **91**(3A): 3A-6A.
- Lilly, L. S. (2010). Pathophysiology of Heart Disease: A Collaborative Project of Medical Students and Faculty, Lippincott Williams & Wilkins.
- Lip, G. Y. and C. R. Gibbs (1999). "Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's triad revisited." J Am Coll Cardiol **33**(5): 1424-1426.
- Lippi, G., M. Montagnana, et al. (2008). "The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease." Clin Chim Acta **392**(1-2): 1-7.
- Loke, I., I. B. Squire, et al. (2003). "Reference ranges for natriuretic peptides for diagnostic use are dependent on age, gender and heart rate." Eur J Heart Fail **5**(5): 599-606.
- Lüllmann, H. (2011). Color atlas of pharmacology. Stuttgart; New York, NY, Thieme.
- Luster, A. D., R. Alon, et al. (2005). "Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets." Nat Immunol **6**(12): 1182-1190.
- Maddox, J. F. (1997). "Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein linked lipoxin A4 receptor." J. Biol. Chem. **272**: 6972-6978.
- Maddox, J. F., S. P. Colgan, et al. (1998). "Lipoxin B4 regulates human monocyte/neutrophil adherence and motility: design of stable lipoxin B4 analogs with increased biologic activity." FASEB J **12**(6): 487-494.
- Maderna, P. and C. Godson (2009). "Lipoxins: resolutionary road." Br J Pharmacol **158**(4): 947-959.
- Maeder, M. T. and D. M. Kaye (2009). "Heart Failure With Normal Left Ventricular Ejection Fraction." J Am Coll Cardiol **53**(11): 905-918.
- Mahmood, N., T. Naseem, et al. (2011). "Serum bilirubin and antioxidant levels in first degree relatives of patients with ischemic heart disease and normal subjects." J Ayub Med Coll Abbottabad **23**(1): 96-98.
- Maisel, A. S., P. Krishnaswamy, et al. (2002). "Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure." N Engl J Med **347**(3): 161-167.
- Majno, G. and I. Joris (2004). Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology. New York, Oxford University Press.
- Malech, H. L. and W. M. Nauseef (1997). "Primary inherited defects in neutrophil function: etiology and treatment." Semin Hematol **34**(4): 279-290.
- Mallat, Z., I. Philip, et al. (1998). "Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure." Circulation **97**(16): 1536-1539.

- Malle, E., P. G. Furtmuller, et al. (2007). "Myeloperoxidase: a target for new drug development?" Br J Pharmacol **152**(6): 838-854.
- Mann, D. L. (2002). "Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future." Circ Res **91**(11): 988-998.
- Masson, S., R. Latini, et al. (2008). "Prognostic value of changes in N-terminal pro-brain natriuretic peptide in Val-HeFT (Valsartan Heart Failure Trial)." J Am Coll Cardiol **52**(12): 997-1003.
- McMahon, B. and C. Godson (2004). "Lipoxins: endogenous regulators of inflammation." American Journal of Physiology - Renal Physiology **286**(2): F189-F201.
- McMurray, J. J. V. (2010). "Systolic Heart Failure." New England Journal of Medicine **362**(3): 228-238.
- Milne, G. L., H. Yin, et al. (2011). "Isoprostane Generation and Function." Chemical Reviews **111**(10): 5973-5996.
- Montuschi, P., P. Barnes, et al. (2007). "Insights into Oxidative Stress: The Isoprostanes." Current Medicinal Chemistry **14**(6): 703-717.
- Morrow, D. A., C. P. Cannon, et al. (2007). "National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes." Circulation **115**(13): e356-375.
- Morrow, D. A. and J. A. de Lemos (2007). "Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers." Circulation **115**(8): 949-952.
- Mudd, J. O. and D. A. Kass (2008). "Tackling heart failure in the twenty-first century." Nature **451**(7181): 919-928.
- Nauseef, W. M. (1988). "Myeloperoxidase deficiency." Hematol Oncol Clin North Am **2**(1): 135-158.
- Nauseef, W. M., I. Olsson, et al. (1988). "Biosynthesis and processing of myeloperoxidase--a marker for myeloid cell differentiation." Eur J Haematol **40**(2): 97-110.
- Nieminen, M. S., M. Bohm, et al. (2005). "Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology." Eur Heart J **26**(4): 384-416.
- Packard, C. J., D. S. O'Reilly, et al. (2000). "Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group." N Engl J Med **343**(16): 1148-1155.
- Paul-Clark, M. J., T. van Cao, et al. (2004). "15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation." J. Exp. Med. **200**: 69-78.
- Peacock, W. F. t., T. De Marco, et al. (2008). "Cardiac troponin and outcome in acute heart failure." N Engl J Med **358**(20): 2117-2126.
- Pearson, T. A., G. A. Mensah, et al. (2003). "Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association." Circulation **107**(3): 499-511.
- Pepys, M. B. and G. M. Hirschfield (2003). "C-reactive protein: a critical update." The Journal of Clinical Investigation **111**(12): 1805-1812.
- Pirro, M., J. Bergeron, et al. (2001). "Age and duration of follow-up as modulators of the risk for ischemic heart disease associated with high plasma C-reactive protein levels in men." Arch Intern Med **161**(20): 2474-2480.
- Polidori, M. C., D. Pratico, et al. (2004). "Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity." J Card Fail **10**(4): 334-338.
- Poole-Wilson, P. A. (2005). "Heart Failure: A Comprehensive Guide to Diagnosis and Treatment." New England Journal of Medicine **353**(2): 212-214.
- Ramani, G. V., P. A. Uber, et al. (2010). "Chronic Heart Failure: Contemporary Diagnosis and Management." Mayo Clinic Proceedings **85**(2): 180-195.

- Rhodes, B., B. G. Furnrohr, et al. (2011). "C-reactive protein in rheumatology: biology and genetics." Nat Rev Rheumatol **7**(5): 282-289.
- Robbins, S. L., V. Kumar, et al. (2010). Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier.
- Romano, M., G. Lucioti, et al. (2002). "Urinary Excretion of Lipoxin A4 and Related Compounds: Development of New Extraction Techniques for Lipoxins." Lab Invest **82**(9): 1253-1254.
- Romano, M., I. Recchia, et al. (2007). "Lipoxin receptors." ScientificWorldJournal **7**: 1393-1412.
- Romano, M. and C. N. Serhan (1992). "Lipoxin generation by permeabilized human platelets." Biochemistry **31**: 8269-8277.
- Rosamond, W. (2008). "Heart disease and stroke statistics [mdash] 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." Circulation **117**: e25-e146.
- Rudiger, A., O. A. Burckhardt, et al. (2006). "The relative lymphocyte count on hospital admission is a risk factor for long-term mortality in patients with acute heart failure." Am J Emerg Med **24**(4): 451-454.
- Ryan, A. and C. Godson (2010). "Lipoxins: regulators of resolution." Curr Opin Pharmacol **10**(2): 166-172.
- Samuelsson, B., C. D. Funk, et al. (1989). "Molecular biology of leukotriene and lipoxin formation." Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res **19**: 1-10.
- Santos-Silva, A., M. I. Rebelo, et al. (2001). "Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents." Clin Chim Acta **306**(1-2): 119-126.
- Schaloske, R. H. and E. A. Dennis (2006). "The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1761**(11): 1246-1259.
- Schindhelm, R. K., L. P. van der Zwan, et al. (2009). "Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification?" Clin Chem **55**(8): 1462-1470.
- Schwab, J. M., N. Chiang, et al. (2007). "Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes." Nature **447**: 869-874.
- Sciarretta, S., A. Ferrucci, et al. (2007). "Markers of inflammation and fibrosis are related to cardiovascular damage in hypertensive patients with metabolic syndrome." Am J Hypertens **20**(7): 784-791.
- Sela, S., R. Shurtz-Swirski, et al. (2005). "Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease." J Am Soc Nephrol **16**(8): 2431-2438.
- Serhan, C. N. (1989). "On the relationship between leukotriene and lipoxin production by human neutrophils: evidence for differential metabolism of 15-HETE and 5-HETE." Biochim Biophys Acta **1004**(2): 158-168.
- Serhan, C. N. (1994). "Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism **1212**(1): 1-25.
- Serhan, C. N. (1995). "Leukocyte transmigration, chemotaxis, and oxygenated derivatives of arachidonic acid: when is chirality important?" Am J Respir Cell Mol Biol **12**(3): 251-253.
- Serhan, C. N. (2000). "Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing." J. Exp. Med. **192**: 1197-1204.
- Serhan, C. N. (2004). "A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution." Histochem. Cell Biol. **122**: 305-321.
- Serhan, C. N. (2005). "Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **73**(3-4): 141-162.

- Serhan, C. N. (2006). "Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes." J. Immunol. **176**: 1848-1859.
- Serhan, C. N., N. Chiang, et al. (2008). "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators." Nat Rev Immunol **8**(5): 349-361.
- Serhan, C. N., M. Hamberg, et al. (1984). "Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(17): 5335-5339.
- Serhan, C. N., J. F. Maddox, et al. (1995). "Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils." Biochemistry **34**: 14609-14615.
- Serhan, C. N. and K. A. Sheppard (1990). "Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro." J Clin Invest **85**(3): 772-780.
- Serhan, C. N., S. Yacoubian, et al. (2008). "Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease **3**(1): 279-312.
- Shah, A. M. and D. L. Mann (2011). "In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science." Lancet **378**(9792): 704-712.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." European Journal of Biochemistry **215**(2): 213-219.
- Siflinger-Birnboim, A. and A. B. Malik (1996). "Regulation of endothelial permeability by second messengers." New Horiz **4**(1): 87-98.
- Sousa, T., J. Afonso, et al. (2012). Lipid Peroxidation and Antioxidants in Arterial Hypertension. Lipid Peroxidation. A. Catala, InTech: 345-392.
- Sousa, T., S. Oliveira, et al. (2012). "Role of H(2)O(2) in hypertension, renin-angiotensin system activation and renal medullary dysfunction caused by angiotensin II." Br J Pharmacol **166**(8): 2386-2401.
- Sousa, T., D. Pinho, et al. (2008). "Role of superoxide and hydrogen peroxide in hypertension induced by an antagonist of adenosine receptors." Eur J Pharmacol **588**(2-3): 267-276.
- Stables, M. J. and D. W. Gilroy (2011). "Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution." Prog Lipid Res **50**(1): 35-51.
- Stenke, L., B. Nasman-Glaser, et al. (1991). "Lipoxygenase products in myeloproliferative disorders: increased leukotriene C4 and decreased lipoxin formation in chronic myeloid leukemia." Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res **21B**: 883-886.
- Stenvinkel, P., E. Rodriguez-Ayala, et al. (2006). "Statin treatment and diabetes affect myeloperoxidase activity in maintenance hemodialysis patients." Clin J Am Soc Nephrol **1**(2): 281-287.
- Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." Physiol Rev **84**(4): 1381-1478.
- Sugiura, T., H. Takase, et al. (2005). "Circulating levels of myocardial proteins predict future deterioration of congestive heart failure." Journal of Cardiac Failure **11**(7): 504-509.
- Suzuki, K., H. Ota, et al. (1983). "Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes." Anal Biochem **132**(2): 345-352.
- Takano, T. (1997). "Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and LXA4 stable analogs are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors." J. Exp. Med. **185**: 1693-1704.
- Takano, T., C. B. Clish, et al. (1998). "Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues." The Journal of Clinical Investigation **101**(4): 819-826.
- Takimoto, E. and D. A. Kass (2007). "Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling." Hypertension **49**: 241-248.

- Tamhane, U. U., S. Aneja, et al. (2008). "Association Between Admission Neutrophil to Lymphocyte Ratio and Outcomes in Patients With Acute Coronary Syndrome." The American journal of cardiology **102**(6): 653-657.
- Tang, W. H., M. L. Brennan, et al. (2006). "Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure." Am J Cardiol **98**(6): 796-799.
- Tang, W. H. W., M.-L. Brennan, et al. (2006). "Plasma Myeloperoxidase Levels in Patients With Chronic Heart Failure." The American journal of cardiology **98**(6): 796-799.
- Tereshchenko, S. N., N. N. Levchuk, et al. (2000). "[Level of blood uric acid in patients with postinfarction heart failure]." Ter Arkh **72**(9): 57-60.
- Ting, H. J. and F. T. Khasawneh (2010). "Platelet function and Isoprostane biology. Should isoprostanes be the newest member of the orphan-ligand family?" J Biomed Sci **17**(1): 24.
- Tsutamoto, T., A. Wada, et al. (1997). "Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction." Circulation **96**(2): 509-516.
- Ungvari, Z., S. A. Gupte, et al. (2005). "Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure." Curr Vasc Pharmacol **3**(3): 221-229.
- Uretsky, B. F., K. Thygesen, et al. (2000). "Acute coronary findings at autopsy in heart failure patients with sudden death: results from the assessment of treatment with lisinopril and survival (ATLAS) trial." Circulation **102**(6): 611-616.
- Uthamalingam, S., E. A. Patvardhan, et al. (2011). "Utility of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term outcomes in acute decompensated heart failure." Am J Cardiol **107**(3): 433-438.
- Vickery, S., C. P. Price, et al. (2005). "B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with CKD: Relationship to renal function and left ventricular hypertrophy." American Journal of Kidney Diseases **46**(4): 610-620.
- Wallace, T. W., S. M. Abdullah, et al. (2006). "Prevalence and determinants of troponin T elevation in the general population." Circulation **113**(16): 1958-1965.
- Wang, T. J., M. G. Larson, et al. (2004). "Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death." N Engl J Med **350**(7): 655-663.
- Wu, A. H. and L. Ford (1999). "Release of cardiac troponin in acute coronary syndromes: ischemia or necrosis?" Clin Chim Acta **284**(2): 161-174.
- Xue, C., H. Yu, et al. (2003). "Clinical significance of serum cardiac troponin T in patients with congestive heart failure." Chin Med J (Engl) **116**(3): 469-471.
- Yin, W.-H., J.-W. Chen, et al. (2004). "Independent prognostic value of elevated high-sensitivity C-reactive protein in chronic heart failure." American heart journal **147**(5): 931-938.
- Young, I. S. and J. V. Woodside (2001). "Antioxidants in health and disease." Journal of Clinical Pathology **54**(3): 176-186.
- Zhang, C., J. Yang, et al. (2003). "Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(6): H2563-2572.
- Zimmet, J. M. and J. M. Hare (2006). "Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system." Circulation **114**(14): 1531-1544.